FUNDAMENTOS DA
BIOLOGIA CELULAR

3ª Edição

Alberts Bray Hopkin Johnson
Lewis Raff Roberts Walter

OS AMINOÁCIDOS E SEUS SÍMBOLOS			CÓDONS					
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU				
Ácido glutâmico	Glu	E	GAA	GAG				
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Lisina	Lys	K	AAA	AAG				
Histidina	His	H	CAC	CAU				
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU				
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG				
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU				
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU				
Metionina	Met	M	AUG					
Triptofano	Trp	W	UGG					
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU				
Códons de terminação			UAA	UAG	UGA			

Chave: Aminoácidos polares carregados negativamente estão em *verde*; aminoácidos polares carregados positivamente estão em *cinza*; aminoácidos polares não carregados estão em *laranja*; e aminoácidos não polares, em *azul*.

COMPRIMENTO		
1 km (quilômetro)	=	10^{3} m
1 m (metro)		
1 cm (centímetro)	=	10^{-2} m
1 mm (milímetro)	=	10^{-3} m
1 µm (micrômetro)	=	10^{-6} m
1 nm (nanômetro)	=	10^{-9} m
1 Å (Ångstron)	=	10^{-10} m

MASSA		
1 kg (quilograma)	=	10^{3} g
1 g (grama)		
1 mg (miligrama)	=	10^{-3} m
1 µg (micrograma)	=	10^{-6} m
1 ng (nanograma)	=	10^{-9} m

VOLUME					
1 L (litro)			=	$(10^{-1}$ m$)^{3}$	
1 mL (mililitro)	=	10^{-3} L	=	$(10^{-2}$ m$)^{3}$	= 1 cm^{3}
1 µL (microlitro)	=	10^{-6} L	=	$(10^{-3}$ m$)^{3}$	= 1 mm^{3}
1 nL (nanolitro)	=	10^{-9} L	=	$(10^{-4}$ m$)^{3}$	

CONCENTRAÇÃO		
1 M (molar)	=	1 mol/L = 6,02 x 10^{23} moléculas/L
1 mM (milimolar)	=	10^{-3} M
1 µM (micromolar)	=	10^{-6} M
1 nM (nanomolar)	=	10^{-9} M

CONSTANTES ÚTEIS, CONVERSÕES E DEFINIÇÕES		
1 mol	=	6,02 × 10^{23} moléculas/L
1 c (caloria)	=	calor necessário para aumentar a temperatura de 1 g de água por 1°C
1 J (jaule)	=	0,239 c
1 kcal (quilocaloria)	=	10^{3} c = 4,18 kJ (kilojaules)
1 L de água	=	1 kg (a 4°C)
1 d (dálton)	=	massa aproximada de um átomo de hidrogênio (1,7 × 10^{23} g)
1 kd (quilodálton)	=	10^{3} d
Massa da terra	=	10^{24} kg
Genoma das bactérias	=	0,5-5 × 10^{6} pares de nucleotídeos, dependendo do organismo
Genoma humano	=	3 × 10^{9} pares de nucleotídeos (haploide)

Equipe de tradução

Ardala Elisa Breda Andrade (Caps. 4, 11)

Mestre e Doutoranda em Biologia Celular e Molecular pela
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Sul (PUCRS).

Carlos Termignoni (Caps. 2, 3)

Professor adjunto do Departamento de Bioquímica e pesquisador do Centro de
Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
Doutor em Biologia Molecular pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Cláudia Paiva Nunes (Caps. 8, 9)

Pesquisadora da Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento Ltda, TECNOPUC.
Mestre e Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica pela UFRGS.

Cristopher Zandoná Schneider (Cap. 12)

Pesquisador do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB) e do
Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional/Instituto de Pesquisas Biomédicas
(CPBMF/IPB) da PUCRS. Mestre e Doutor em Biologia Celular e Molecular pela UFRGS.

Denise C. Machado (Caps. 5, 20)

Professora e pesquisadora do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da PUCRS.
Doutora em Imunologia pela University of Sheffield, Inglaterra.

Gaby Renard (Caps. 1, 10, 13, 15, glossário)

Pesquisadora da Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento, TECNOPUC.
Mestre e Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica pela UFRGS.

Gustavo Roth (iniciais, índice)

Engenheiro químico. Mestrando em Biologia Molecular e Celular pela PUCRS.

José Arthur B. Chies (Caps. 17, 19)

Professor associado do Departamento de Genética da UFRGS.
Mestre em Genética e Biologia Molecular pela UFRGS.
Doutor em Sciences de La Vie Specialité en Immunologie pela
Université de Paris VI (Pierre et Marie Curie).

Leandro Vieira Astarita (Cap. 14)

Biólogo. Professor adjunto da Faculdade de Biociências da PUCRS.
Doutor em Botânica pela Universidade de São Paulo (USP).

Rosane Machado Scheibe (Cap. 6)

Doutora em Biologia Molecular pela University of Sheffield, Inglaterra.

FUNDAMENTOS DA
BIOLOGIA CELULAR
3ª Edição

Alberts Bray Hopkin Johnson
Lewis Raff Roberts Walter

Consultoria, supervisão e revisão técnica desta edição:

Gaby Renard
Pesquisadora da Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento, TECNOPUC.
Mestre e Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica pela UFRGS.

Jocelei Maria Chies
Pesquisadora do IPB/PUCRS.
Doutora em Biologia Molecular pela Universidade de Brasília (UnB).

Versão impressa
desta obra: 2011

2012

Autores

Bruce Alberts é Ph.D. pela Harvard University e Professor de Bioquímica e Biofísica na University of Califórnia, San Francisco. Ele é editor chefe da revista *Science*. Durante 12 anos ele atuou como Presidente da U.S. National Academy of Sciences (1993-2005).

Dennis Bray é Ph.D. pelo Massachusetts Institute of Technology e atualmente é professor emérito na ativa da University of Cambridge. Em 2006, ele foi condecorado com prêmio Microsoft European Science.

Karen Hopkin é Ph.D. em bioquímica pelo Albert Einstein College of Medicine e escritora na área de Ciências em Somerville, Massachusetts.

Alexander Johnson é Ph.D. pela Harvard University e Professor de Microbiologia e Imunologia e diretor do programa de graduação em Bioquímica, Biologia Celular, Genética e Biologia do Desenvolvimento da University of California, São Francisco.

Julian Lewis é D.Phil pela University of Oxford e cientista-chefe na London Research Institute of Cancer Research, UK.

Martin Raff é M.D. pela McGill University e atua na Medical Research Council Laboratory for Molecular Cell Biology e Cell Biology Unit e no Biology Departament na University College London.

Keith Roberts é Ph.D. pela University of Cambridge e pesquisador-diretor associado no John Innes Center, Norwich.

Peter Walter é Ph.D. pelo The Rockefeller University em Nova York; é professor e chefe do Department of Biochemistry and Biophysics na University of California, São Francisco, e pesquisador do Howard Hughes Medical Institute.

Agradecimentos

Agradecemos às diversas contribuições de professores e estudantes do mundo todo na criação desta 3ª edição. Em particular, somos gratos aos estudantes que participaram dos grupos focais, os quais trouxeram informações inestimáveis sobre suas experiências usando o livro e os recursos complementares, muitas delas implementadas nesta edição.

Gostaríamos de agradecer também aos professores que ajudaram a organizar os grupos focais em suas escolas: Chris Brandl, da University of Western Ontario, David L. Gard, da University of Utah, Juliet Spencer, da University of San Francisco, e Keren Witkin e Linda Huang, da University of Massachusetts, Boston. Estimamos muito a sua hospitalidade.

Recebemos também revisões detalhadas de professores usando a 2ª edição e gostaríamos de agradecê-los por seu trabalho: Margarida D. Amaral, University of Lisbon; Lynne Arneson, American University; Karl Aufderheide, Texas A&M University; David K. Banfield, The Hong Kong University of Science and Technology; Stephen F. Baron, Bridgewater College; Deborah Bielser, University of Illinois at Urbana-Champaign; Barbara D. Boyan, Georgia Institute of Technology; Chris Brandl, University of Western Ontario; Keith Brown, University of Bristol; Jane Bruner, California State University Stanislaus; Patrick Bryan, Middlesex Community College; Sharon K. Bullock, Virginia Commonwealth University; Mike Clemens, St. George's Hospital Medical School, University of London; Anne Cordon, University of Toronto at Mississauga; Andrew Dalby, University of Exeter; Dan Eshel, Brooklyn College; Nicolas Forraz, Kingston University; David L. Gard, University of Utah; Mark Grimes, University of Montana; Hollie Hale-Donze, Louisiana State University; Lynn Hannum, Colby College; Na'il M. Hasan, Birzeit University; Jeannette M. Loutsch, Arkansas State University; Charles Mallery, University of Miami; Kathy Martin-Troy, Central Connecticut State University; Gordon T.A. McEwan, Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen; Colin McGuckin, Kingston University; Gerard McNeil, York College, The City University of New York; Roger W. Melvold, University of North Dakota, School of Medicine & Health Sciences; Cristina Murga, Universidad Autónoma de Madrid; T. Page Owen, Jr., Connecticut College; Martin Rumsby, University of York; Esther Siegfried, University of Pittsburgh at Johnstown; Roger D. Sloboda, Dartmouth College; Julio Soto, San Jose State University; Juliet Spencer, University of San Francisco; Paul H. Tomasek, California State University Northridge; Gary Wessel, Brown University; Esther F. Wheeler, Texas Tech University; Keren Witkin, University of Massachusetts, Boston.

Um agradecimento especial a David Morgan por sua ajuda na formulação e na revisão do capítulo reorganizado sobre divisão celular.

Somos muito gratos também aos leitores que nos alertaram sobre erros encontrados na edição anterior.

Muitos assistentes da equipe da Garland contribuíram na elaboração deste livro e fizeram com que fosse um prazer trabalhar nele. Primeiramente, temos uma dívida especial com Michael Morales, nosso editor, que coordenou todo o projeto. Ele organizou a revisão inicial e os grupos focais, trabalhou muito próximo aos autores nos seus capítulos, estimulou-nos quando estávamos atrasados e teve um grande papel no *design*, na montagem e na produção dos materiais complementares. Sigrid Masson administrou o andamento dos capítulos durante o processo de produção, leu e avaliou o livro inteiro e também supervisionou parte do conteúdo complementar. **Os organizadores** Kate Ghezzi e Monica Toledo deram assistência editorial. Nigel Orme tomou os desenhos originais criados pelo autor Keith Roberts e os redesenhou no computador, ou ocasionalmente à mão, com habilidade e aptidão. Para Matt McClements vai o crédito pelo desenho gráfico do livro e do DVD. Emma Jeffcock fez um trabalho brilhante no projeto gráfico do livro inteiro e na correção dos nossos intermináveis erros. Eleanor Lawrence e Sherry Granum atuaram com editores dos capítulos individualmente, consertaram vários detalhes grosseiros, e Eleanor não só leu o livro do começo ao final por clareza e consistência, mas também revisou e aumentou o glossário. Adam Sendroff e Lucy Brodie reuniram informações de usuários e as analisaram para tornar a obra mais universal. Denise Schanck, vice-presidente da Garland Science, orquestrou tudo isso com magnífico gosto e diplomacia. Agradecemos a todos dessa extensa lista.

Por último, mas não com menos importância, somos gratos, mais uma vez, às nossas famílias, aos nossos colegas e às nossas babás pelo apoio e pela tolerância.

Prefácio

No nosso mundo, não existe forma de matéria mais espantosa do que uma célula viva: pequenina, frágil, maravilhosamente complexa, de modo contínuo renovando-se, porém ainda preservando no seu DNA informações datando de mais de três bilhões de anos, um tempo no qual nosso planeta mal havia esfriado dos materiais quentes do sistema solar nascente. Incessantemente "reengenhada e diversificada" pela evolução, extraordinariamente versátil e adaptável, a célula ainda retém um complexo mecanismo químico de autorreaplicação que é compartilhado e repetido de maneira interminável em todos os organismos vivos na face da Terra, em todo animal, em toda folha, em toda bactéria em um pedaço de queijo e em toda levedura no barril de vinho.

A curiosidade, nada mais, deveria nos levar a estudar biologia celular; porém, existem razões práticas também porque a biologia celular deveria fazer parte da educação de cada um. Somos feitos de células, nos alimentamos de células, e nosso mundo é habitável por causa das células. Precisamos entender a biologia celular para nos entendermos, para cuidar da nossa saúde, para cuidar do nosso abastecimento de comida e para proteger nossos ecossistemas ameaçados. O desafio para os cientistas é aprofundar o conhecimento e descobrir novas maneiras de aplicá-lo. Todavia, todos nós, como cidadãos, precisamos nos esforçar para saber algo a respeito e acompanhar o mundo moderno, tanto quando se trata de complicações com a nossa saúde como também quando se envolvem grandes problemas públicos, como mudanças no meio ambiente, tecnologia biomédica, agricultura e doenças epidêmicas.

A biologia celular é um assunto amplo e está ligado a quase todos os outros ramos da ciência. Portanto, o estudo da biologia celular fornece uma grande educação científica. Contudo, é fácil perder-se nos detalhes e distrair-se com a sobrecarga de informações e terminologia técnica. Neste livro, portanto, nos detivemos em prover os princípios essenciais de maneira clara, digerível e confiável. Procuramos explicar, de uma maneira que até um leitor que se aproxima da biologia molecular pela primeira vez entenda, como uma célula viva funciona: mostrar como as moléculas da célula – especialmente as moléculas de proteína, DNA e RNA – cooperam, criando esse notável sistema que se alimenta, responde a estímulos, move-se, cresce, divide-se e duplica-se.

A necessidade de criação de *Fundamentos da biologia celular* se tornou aparente para nós enquanto estávamos escrevendo *Biologia molecular da célula* (*MBoC*), atualmente na sua 5ª edição. O *MBoC* é um extenso livro para estudantes avançados de graduação e graduados que buscam especialização na vida científica ou médica. Muitos estudantes e pessoas com instrução, as quais requerem uma aproximação introdutória à biologia celular, encontrarão no *MBoC* informações muito detalhadas para suas necessidades. *Fundamentos da biologia celular* (*ECB*), ao contrário, foi desenvolvido para conter as informações essenciais da biologia celular, necessárias para entender tanto assuntos da biomedicina quanto da biologia que afetam nossas vidas.

Nesta 3ª edição, atualizamos todas as partes do livro, com novos materiais sobre estrutura cromossômica e epigenética, microRNAs e RNAi, controle de qualidade da proteína, reconhecimento célula-célula, variação genética, células-tronco e seu potencial médico, tratamento racional do câncer, evolução genômica e tantos outros tópicos. Melhoramos nossa discussão sobre energia e termodinâmica, integramos o ciclo celular e a divisão celular em um único capítulo e atualizamos a seção "Como Sabemos", descrevendo experimentos que ilustram como os biólogos resolvem questões importantes e como os resultados experimentais deles moldam ideias futuras.

Como anteriormente, os diagramas do *ECB* enfatizam conceitos centrais e são despojados de detalhes desnecessários. Os termos-chave introduzidos em cada capítulo estão destacados quando aparecem pela primeira vez e foram reunidos no final do livro em um glossário amplo e ilustrado. Não listamos referências para leitura adicional: aqueles que desejam explorar algum assunto mais profundamente são encorajados a consultar as listas de leitura no *MBoC5* ou procurar revisões recentes na literatura atual por meio dos mais poderosos instrumentos de busca, como Pubmed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ou Google Scholar (http://scholar.google.com).

As características centrais deste livro são as diversas questões que são apresentadas nas margens do texto e ao final de cada capítulo. Elas são formuladas para instigar os estudantes a pensar no que leram e encorajá-los a dar uma pausa e testar seu aprendizado. Muitas questões desafiam o estudante a colocar o conhecimento recém-adquirido em um contexto biológico mais amplo, e algumas delas têm mais de uma resposta válida. Outras permitem especulação. Respostas para todas as questões são dadas ao final do livro; em muitos casos, essas fornecem um comentário ou uma alternativa para o que foi apresentado no texto principal.

Para aqueles que querem aprofundar seus conhecimentos em biologia celular e entender melhor como biólogos celulares chegam a conclusões por meio de experimentos, recomendamos o *Molecular biology of cell*: *a problems approach,* 5th edition, de John Wilson e Tim Hunt. Embora tenha sido escrito para complementar o *MBoC,* esse livro contém questões de todos os níveis de dificuldade e é uma mina de ouro de problemas para reflexão de professores e alunos. Recorremos a ele para algumas questões do *ECB* e somos muito gratos aos autores.

Como no *MBoC*, cada capítulo do *ECB* é produto de esforço comunal, com esboços individuais circulando de um autor para outro. Além disso, muitas pessoas nos ajudaram e são creditadas nos agradecimentos. Apesar de todos os nossos maiores esforços, é inevitável que existam erros no livro. Encorajamos os leitores que os encontrarem a nos contatarem por meio do science@garland.com; assim, poderemos corrigi-los na próxima impressão.

MATERIAIS COMPLEMENTARES

DVD-ROM (em inglês)

A explosão de novas tecnologias de imagem e computação continuam a dar perspectivas atuais e espetaculares do trabalho interno da célula viva. Tentamos capturar uma parte da excitação desses avanços na versão revisada e aumentada do DVD-ROM anexo ao livro. Ele contém mais de 130 vídeos, animações, estruturas moleculares e micrografias em alta resolução – todos projetados para complementar cada capítulo do livro. Não é possível observar as células rastejando, dividindo-se, segregando seus cromossomos ou rearranjando sua superfície sem sentir-se maravilhado com os mecanismos moleculares responsáveis por estes processos. Para ter uma sensação vívida dos espetáculos que a ciência revela em nosso dia a dia, é difícil encontrar uma animação de replicação de DNA, como a fornecida no DVD. Esperamos que ele motive e intrigue os estudantes, bem como reforce os conceitos básicos citados no texto e, com isso, facilite e torne o aprendizado da biologia celular recompensador.

Área do Professor

Visite a Área do Professor em **www.grupoa-editoras.com.br** para ter acesso a PowerPoints® (em português) com as figuras da obra e a outros materiais que poderão ser utilizados como recursos didáticos em sala de aula.

Sumário

Sumário Detalhado

CAPÍTULO 1

Introdução às Células

O que significa estar vivo? Pessoas, petúnias e algas estão vivas; pedras, areia e brisa de verão não estão. Contudo, quais são as principais propriedades que caracterizam as coisas vivas e as distinguem da matéria sem vida?

A resposta inicia com o fato básico, que é dado como certo por biólogos no momento, mas marcou uma revolução no pensamento quando estabelecido pela primeira vez há 170 anos. Todas as coisas vivas são feitas de **células**: pequenas unidades limitadas por membranas preenchidas com uma solução aquosa concentrada de compostos e dotadas de uma capacidade extraordinária de criar cópias delas mesmas pelo seu crescimento e pela sua divisão em duas. As formas mais simples de vida são células solitárias. Organismos superiores, incluindo nós mesmos, são comunidades de células derivadas do crescimento e da divisão a partir de uma única célula fundadora: cada animal, planta ou fungo é uma vasta colônia de células individuais que realizam funções especializadas coordenadas por complicados sistemas de comunicação.

As células, portanto, são as principais unidades de vida, e é na *biologia celular* que devemos procurar por uma resposta para a questão de o que é vida e como ela funciona. Com uma compreensão mais profunda da estrutura, da função, do comportamento e da evolução celular, poderemos enfrentar os grandes problemas históricos da vida na Terra: as suas origens misteriosas, a sua maravilhosa diversidade e a sua invasão em cada hábitat imaginável. Ao mesmo tempo, a biologia celular pode nos fornecer as respostas para as questões que temos sobre nós mesmos: de onde viemos? Como nos desenvolvemos a partir de um único óvulo fertilizado? Como cada um de nós é diferente de cada outra pessoa na Terra? Por que ficamos doentes, envelhecemos e morremos?

Neste capítulo, iniciamos olhando para a grande variedade de formas que as células podem apresentar e também damos uma rápida olhada na maquinaria química que todas as células têm em comum. Então, consideraremos como as células se tornam visíveis sob o microscópio e o que vemos quando observamos atentamente dentro delas. Por fim, discutiremos como podemos explorar

as similaridades entre os seres vivos para alcançar uma compreensão coerente de todas as formas de vida na Terra – a partir da bactéria mais minúscula até o imenso carvalho.

UNIDADE E DIVERSIDADE DAS CÉLULAS

Biólogos celulares frequentemente falam sobre "a célula" sem especificar qualquer célula em particular. Entretanto, as células não são todas semelhantes; na verdade, elas podem ser muito diferentes. Estima-se que existam no mínimo 10 milhões – talvez 100 milhões – de espécies distintas de seres vivos no mundo. Antes de pesquisar mais a fundo a biologia celular, devemos nos perguntar: o que uma bactéria tem em comum com as células de uma borboleta, o que as células de uma rosa têm em comum com as de um golfinho? E de que maneira elas diferem?

As células variam muito em aparência e função

Comecemos pelo tamanho. Uma célula bacteriana – digamos um *Lactobacillus* em um pedaço de queijo – tem poucos **micrômetros**, ou μm, de comprimento. Isso é cerca de 25 vezes menor do que a espessura de um cabelo humano. Um ovo de sapo – que também é uma célula única – possui um diâmetro de cerca de 1 milímetro. Se aumentássemos a escala de modo que o *Lactobacillus* tivesse o tamanho de uma pessoa, o ovo de sapo teria 800 metros de altura.

As células não variam menos nas suas formas e funções. Considere a galeria de células mostradas na Figura 1-1. Uma célula nervosa típica em seu cérebro é enormemente estendida; ela envia seus sinais elétricos ao longo de uma protrusão fina que possui o comprimento 10.000 vezes maior do que a espessura, e ela recebe sinais de outras células através de uma massa de processos mais curtos que brotam de seu corpo como os ramos de uma árvore. Um *Paramecium* em uma gota de água parada tem a forma de um submarino e está coberto por milhares de *cílios* – extensões semelhantes a pelos cujo batimento sinuoso arrasta a célula para frente, rodando-a à medida que ela se locomove. Uma célula na camada superficial de uma planta é um prisma imóvel envolvido por uma caixa rígida de celulose, com uma cobertura externa de cera à prova d'água. A bactéria *Bdellovibrio* é um torpedo com forma de salsicha que se move para frente por um *flagelo* em rotação com forma de saca-rolhas que está anexado à sua parte posterior, onde ele atua como uma hélice. Um neutrófilo ou um macrófago no corpo de um animal se movimenta pelos tecidos, mudando de forma constantemente e englobando restos celulares, microrganismos estranhos e células mortas ou que estão morrendo.

Algumas células estão cobertas apenas por uma fina membrana; outras aumentam essa cobertura delicada ao esconder-se em uma camada externa de muco, construindo para si próprias uma *parede celular* rígida, ou ao envolver-se em um material duro, mineralizado, como aquele encontrado nos ossos.

As células também são muito diversas nas suas necessidades químicas e atividades. Algumas requerem oxigênio para viver; para outras, o oxigênio é letal. Algumas consomem um pouco mais do que ar, luz solar e água como matéria-prima; outras necessitam de uma mistura complexa de moléculas produzidas por outras células. Algumas parecem fábricas especializadas para a produção de determinadas substâncias, como os hormônios, o amido, a gordura, o látex ou os pigmentos. Outras são máquinas, como músculos, queimando combustível para realizar trabalho mecânico; outras são geradores de eletricidade, como as células musculares modificadas na enguia elétrica.

Algumas modificações especializam as células, tanto que elas perdem as suas chances de deixar qualquer descendente. Essa especialização não teria sentido para uma célula que viveu uma vida solitária. Em um organismo multicelular, entretanto, existe uma divisão de trabalho entre as células, permitindo que algumas se tornem especializadas em um grau extremo para determinadas tarefas, deixando-as dependentes das suas células companheiras para várias condições básicas. Até mesmo a necessidade mais básica de todas, aquela de

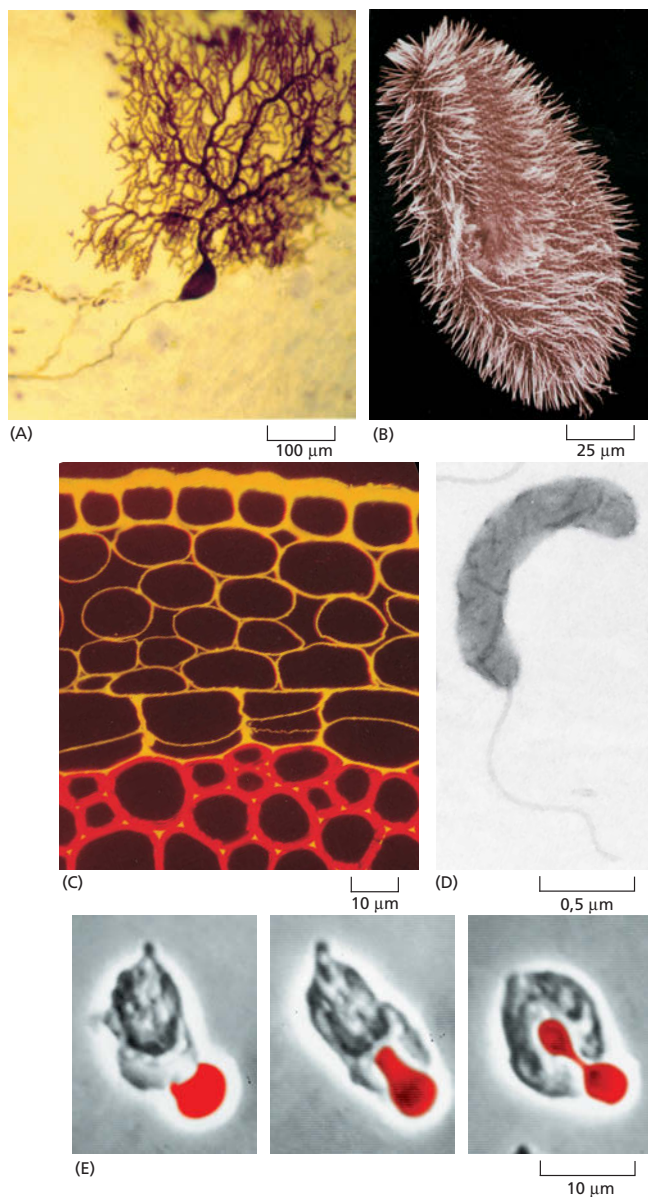



Figura 1-1 As células têm uma variedade de formas e tamanhos. (A) Uma célula nervosa do cerebelo (uma parte do cérebro que controla o movimento). Essa célula tem uma enorme árvore ramificada de prolongamentos, através dos quais ela recebe sinais a partir de pelo menos 100.000 outras células nervosas. (B) *Paramecium.* Esse protozoário – uma célula gigante única – nada por meio dos batimentos dos cílios que cobrem a sua superfície. (C) O corte do caule de uma planta jovem na qual a celulose está corada de *vermelho* e um outro componente da parede celular, pectina, está corado de *laranja.* A camada mais externa de células está no topo da foto. (D) Uma bactéria pequena, *Bdellovibrio bacteriovorus,* que utiliza um único flagelo terminal para se impulsionar. Essa bactéria ataca, mata e se alimenta de outras bactérias maiores. (E) Uma célula branca do sangue de humanos (um neutrófilo) abordando e englobando uma célula vermelha do sangue (eritrócito) (A, cortesia de Constantino Sotelo; B, cortesia de Anne Fleury, Michel Laurent e André Adoutte; D, cortesia de Murry Stein; E, cortesia de Stephen E. Malawista e Anne de Boisfleury Chevance.)

passar as informações genéticas para a próxima geração, está delegada para especialistas – o óvulo e o espermatozoide.

Todas as células vivas têm uma química básica similar

Apesar da extraordinária diversidade dos vegetais e animais, as pessoas reconheceram desde tempos imemoriais que esses organismos têm algo em comum, algo que permite que sejam chamados de seres vivos. Com a invenção do microscópio, tornou-se claro que vegetais e animais são conjuntos de células que também podem existir como organismos independentes e que individualmente estão vivendo, no sentido de que podem crescer, reproduzir, converter energia de uma forma para outra, controlar seu funcionamento interno, responder ao seu meio e assim por diante. No entanto, enquanto pareceu muito fácil reconhecer vida, era extraordinariamente difícil dizer em que sentido todos os seres vivos eram semelhantes. Os livros-texto tiveram de concordar em definir vida em termos gerais abstratos relacionados ao crescimento e à reprodução.

QUESTÃO 1-1

"Vida" é fácil de ser reconhecida, mas difícil de definir. O dicionário define vida como "O estado ou a qualidade que distingue seres ou organismos vivos dos mortos e da matéria inorgânica, caracterizada principalmente por metabolismo, crescimento e capacidade de reproduzir e responder a estímulos". Os livros-texto de biologia normalmente elaboram pouco; por exemplo, de acordo com um texto popular, coisas vivas:

1. São altamente organizadas comparadas a objetos naturais inanimados.
2. Exibem homeostase, mantendo um meio interno relativamente constante.
3. Reproduzem-se.
4. Crescem e se desenvolvem a partir de princípios simples.
5. Tomam energia e matéria a partir do meio e a transformam.
6. Respondem a estímulos.
7. Mostram adaptação ao seu meio.

Defina você mesmo um aspirador de pó e uma batata com relação a essas características.

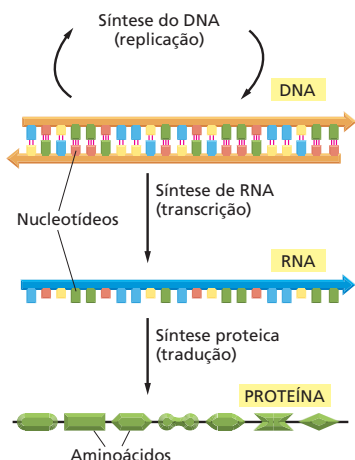



Figura 1-2 Em todas as células vivas, a informação genética flui a partir do DNA para o RNA (transcrição) e a partir do RNA para a proteína (tradução). Juntos esses processos são conhecidos como expressão gênica.

As descobertas da bioquímica e da biologia molecular fizeram esse problema desaparecer de uma maneira espetacular. Embora sejam infinitamente variáveis quando vistos de fora, todos os seres vivos são fundamentalmente similares por dentro. Agora sabemos que as células se parecem umas com as outras em um grau estonteante de detalhes na sua química, compartilhando a mesma maquinaria para as funções mais básicas. Todas as células são compostas pelos mesmos tipos de moléculas que participam nos mesmos tipos de reações químicas (discutido no Capítulo 2). Em todos os seres vivos, as informações genéticas – *genes* – estão armazenadas nas moléculas de DNA escritas no mesmo código químico, formadas com os mesmos blocos químicos de construção, interpretadas essencialmente pela mesma maquinaria química e duplicadas da mesma forma para permitir que o organismo se reproduza. Desse modo, em cada célula, as longas cadeias de polímeros de **DNA** são feitas do mesmo conjunto de quatro monômeros, chamados de *nucleotídeos,* amarrados uns aos outros em diferentes sequências, como as letras de um alfabeto, para carregar diferentes informações. Em cada célula, as instruções no DNA são lidas, ou *transcritas,* em um grupo de polímeros relacionados quimicamente chamado de **RNA** (**Figura 1-2**). As moléculas de RNA possuem uma variedade de funções, mas a principal classe serve como *RNA mensageiro*: as mensagens carregadas por essas moléculas são então *traduzidas,* agora em outro tipo de polímero chamado de *proteína*.

As moléculas proteicas dominam o comportamento da célula, servindo como suportes estruturais, catalistas químicos, motores moleculares e assim por diante. As proteínas são construídas a partir de *aminoácidos*, e cada ser vivo utiliza o mesmo grupo de 20 aminoácidos para sintetizar suas proteínas. Os aminoácidos estão ligados em diferentes sequências, conferindo a cada tipo de molécula proteica diferentes formas tridimensionais, ou *conformação*, assim como diferentes sequências de letras significam diferentes palavras. Dessa maneira, a mesma maquinaria bioquímica básica serviu para gerar toda uma gama de seres vivos (**Figura 1-3**). Uma discussão mais detalhada da estrutura e da função de proteínas, RNA e DNA está presente do Capítulo 4 até o Capítulo 8.

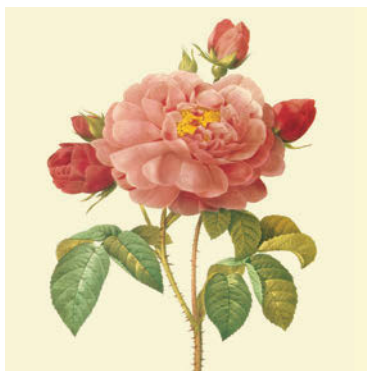



Figura 1-3 Todos os organismos vivos são construídos a partir de células. Uma colônia de bactérias, uma borboleta, uma rosa e um golfinho são todos feitos de células que têm uma química fundamental similar e funcionam de acordo com os mesmos princípios básicos. (A, cortesia de Tony Brain e Science Photo Library; C, cortesia de John Innes Foundation; D, cortesia de Jonathan Gordon, IFAW.)

Se as células são a principal unidade da matéria viva, então, nada menos do que uma célula pode ser verdadeiramente chamada de viva. Os vírus, por exemplo, são pacotes compactos de informação genética – na forma de DNA ou RNA – normalmente envoltos por proteínas, mas não têm a capacidade de se reproduzir por seus próprios esforços. Em vez disso, eles só conseguem ser copiados parasitando a maquinaria reprodutiva das células que eles invadem. Desse modo, os vírus são zumbis químicos: inertes e inativos fora da sua célula hospedeira, mas exercendo um controle maligno, uma vez que conseguem entrar.

Todas as células atuais evoluíram a partir de um mesmo ancestral

Uma célula se reproduz pela duplicação do seu DNA e depois se divide em duas, passando uma cópia das informações genéticas codificadas no seu DNA para cada uma das suas células-filhas. Por isso, as células-filhas se parecem com as células parentais. Entretanto, a cópia nem sempre é perfeita, e as informações são ocasionalmente corrompidas por *mutações* que alteram o DNA. Por essa razão, as células-filhas nem sempre se comparam exatamente com as parentais.

As mutações podem criar descendentes que são alterados para pior (no que eles são menos capazes de sobreviver e reproduzir); alterados para melhor (no que eles são mais capazes de sobreviver e reproduzir); ou alterados de forma neutra (no que eles são geneticamente diferentes, mas igualmente viáveis). A luta pela sobrevivência elimina o primeiro, favorece o segundo e tolera o terceiro. Os genes da próxima geração serão os genes dos sobreviventes. O padrão dos descendentes pode ser complicado pela reprodução sexual, na qual duas células da mesma espécie fusionam, unindo o seu DNA; as cartas genéticas são então embaralhadas, repartidas e distribuídas em novas combinações para a próxima geração para serem novamente testadas pelo seu valor de sobrevivência.

Esses princípios simples de alteração e seleção genética, aplicados repetidamente durante bilhões de gerações de células, são a base da **evolução** – o processo pelo qual as espécies vivas se modificam gradualmente e se adaptam ao seu meio de maneiras cada vez mais sofisticadas. A evolução oferece uma explicação surpreendente, mas convincente, do motivo pelo qual as células dos dias de hoje são tão semelhantes nos seus fundamentos: todas elas herdaram as suas informações genéticas a partir do mesmo ancestral comum. Estima-se que essa célula ancestral existiu entre 3,5 bilhões e 3,8 bilhões de anos atrás, e devemos supor que ela continha um protótipo da maquinaria universal de toda a vida atual na Terra. Por meio de mutações, os seus descendentes divergiram gradualmente para preencher cada hábitat na Terra com seres vivos, explorando o potencial da maquinaria em uma infinita variedade de formas.

QUESTÃO 1-2

As mutações são erros no DNA que alteram o plano genético a partir da geração anterior. Imagine uma fábrica de sapatos. Você esperaria que erros (p. ex., alterações não intencionais) na cópia do desenho do sapato levassem a melhorias nos sapatos produzidos? Explique a sua resposta.

Os genes fornecem as instruções para a forma, a função e o comportamento complexo das células

O **genoma** das células – isto é, toda a biblioteca de informação genética no seu DNA – fornece um programa genético que instrui a célula sobre seu funcionamento e, as células vegetais e animais, sobre seu crescimento para formar um organismo com centenas de diferentes tipos de células. Dentro de uma planta ou animal individual, essas células podem ser extraordinariamente variadas, como discutiremos no Capítulo 20. Células gordurosas, células da pele, células dos ossos e células nervosas parecem tão diferentes quanto quaisquer células poderiam ser. Contudo, todos esses *tipos diferenciados de células* são gerados durante o desenvolvimento embrionário a partir de um óvulo fertilizado, e todas contêm cópias idênticas do DNA da espécie. Suas características variadas se originam a partir do modo pelo qual as células individuais utilizam suas informações genéticas. Diferentes células *expressam* diferentes genes, isto é, elas utilizam seus genes para produzir algumas proteínas e não outras, dependendo dos estímulos que elas e suas células ancestrais receberam do seu ambiente.

O DNA, portanto, não é apenas uma lista de compras especificando as moléculas que cada célula deve ter, e uma célula não é apenas uma montagem de todos os itens da lista. Cada célula é capaz de realizar uma variedade de tarefas biológicas, dependendo do seu ambiente e da sua história, utilizando a informação codificada no seu DNA para guiar as suas atividades. Mais adiante, neste livro, veremos com detalhes como o DNA define tanto a lista das partes da célula como as regras que decidem quando e onde essas partes devem ser sintetizadas.

CÉLULAS SOB O MICROSCÓPIO

Hoje temos a tecnologia para decifrar os princípios subjacentes que governam a estrutura e a atividade da célula. A biologia celular teve início sem essas ferramentas. Os primeiros biólogos, celulares começaram simplesmente observando tecidos e células, então abrindo-as e cortando-as para ver o seu conteúdo. O que eles viram era, para eles, bastante confuso – uma coleção de objetos minúsculos quase que não visíveis cuja relação com as propriedades da matéria viva pareciam um mistério impenetrável. No entanto, esse tipo de investigação visual foi o primeiro passo em direção ao entendimento e permanece essencial no estudo da biologia celular.

Em geral, as células são muito pequenas – pequenas demais para serem vistas a olho nu. Elas não foram visíveis até o século XVII, quando o **microscópio** foi inventado. Por centenas de anos depois, tudo o que se sabia sobre as células foi descoberto utilizando esse instrumento. Os *microscópios ópticos,* que utilizam luz visível para iluminar os espécimes, ainda são peças vitais de equipamentos em um laboratório de biologia celular.

Embora esses instrumentos agora incorporem muitas melhorias sofisticadas, as propriedades da própria luz colocam um limite para a nitidez de detalhes que eles podem revelar. Os *microscópios eletrônicos*, inventados na década de 1930, vão além desse limite pela utilização de feixes de elétrons, em vez de feixes de luz como fonte de iluminação, aumentando grandemente a sua capacidade para ver os finos detalhes das células e até mesmo tornando algumas moléculas grandes visíveis individualmente. Um panorama dos principais tipos de microscopia utilizados para examinar células se encontra no **Painel 1-1** (p. 8-9).

QUESTÃO 1-3

Você se envolveu em um ambicioso projeto de pesquisa: criar vida em um tubo de ensaio. Você ferve uma mistura rica de extrato de levedura e aminoácidos em um frasco junto com uma quantidade de sais inorgânicos sabidamente essenciais para a vida. Você sela o frasco e permite que ele esfrie. Após vários meses, o líquido está claro como sempre e não existem sinais de vida. Um amigo sugere que a exclusão de ar foi um erro, já que a vida, como sabemos, requer oxigênio. Você repete o experimento, mas dessa vez deixa o frasco aberto à atmosfera. Para o seu grande prazer, o líquido se torna turvo após poucos dias e, sob o microscópio, você visualiza bonitas pequenas células que claramente estão crescendo e se dividindo. Esse experimento prova que você conseguiu gerar uma nova forma de vida? Como você planejaria de novo o seu experimento para permitir a entrada de ar no seu frasco, eliminando, contudo, a possibilidade de que a contaminação seja a explicação para os resultados? (Para uma resposta correta, consulte os experimentos de Louis Pasteur.)

A invenção do microscópio óptico levou à descoberta das células

O desenvolvimento do microscópio óptico dependeu dos avanços na produção das lentes de vidro. Pelo século XVII, as lentes foram refinadas a ponto de tornarem possível a fabricação de microscópios simples. Utilizando um instrumento como esse, Robert Hooke examinou um pedaço de rolha e, em 1665, comunicou para a Royal Society de Londres que a cortiça era composta de uma massa de minúsculas câmaras, que ele chamou de "células". O nome "célula" foi estendido até para as estruturas que Hooke descreveu, que eram apenas as paredes celulares que permaneceram depois que as células vegetais vivas dentro delas morreram. Mais tarde, Hooke e seu contemporâneo holandês Antoni van Leeuwenhoek foram capazes de visualizar células vivas, revelando um mundo não visto anteriormente abundante de organismos microscópicos móveis.

Por quase 200 anos, a microscopia óptica permaneceu um instrumento exótico, disponível apenas para poucos indivíduos ricos. Foi apenas no século XIX que ela começou a ser amplamente utilizada para visualizar células. A emergência da biologia celular como uma ciência distinta foi um processo gradual para o qual vários indivíduos contribuíram, mas o seu nascimento oficial foi marcado por duas publicações: uma pelo botânico Matthias Schleiden, em 1838, e a outra pelo zoólogo Theodor Schwann, em 1839. Nesses artigos, Schleiden e Schwann documentaram os resultados de uma investigação sistemática de tecidos vegetais e animais com o microscópio óptico, mostrando que as células eram os blocos universais de construção de todos os tecidos vivos. O seu trabalho e o

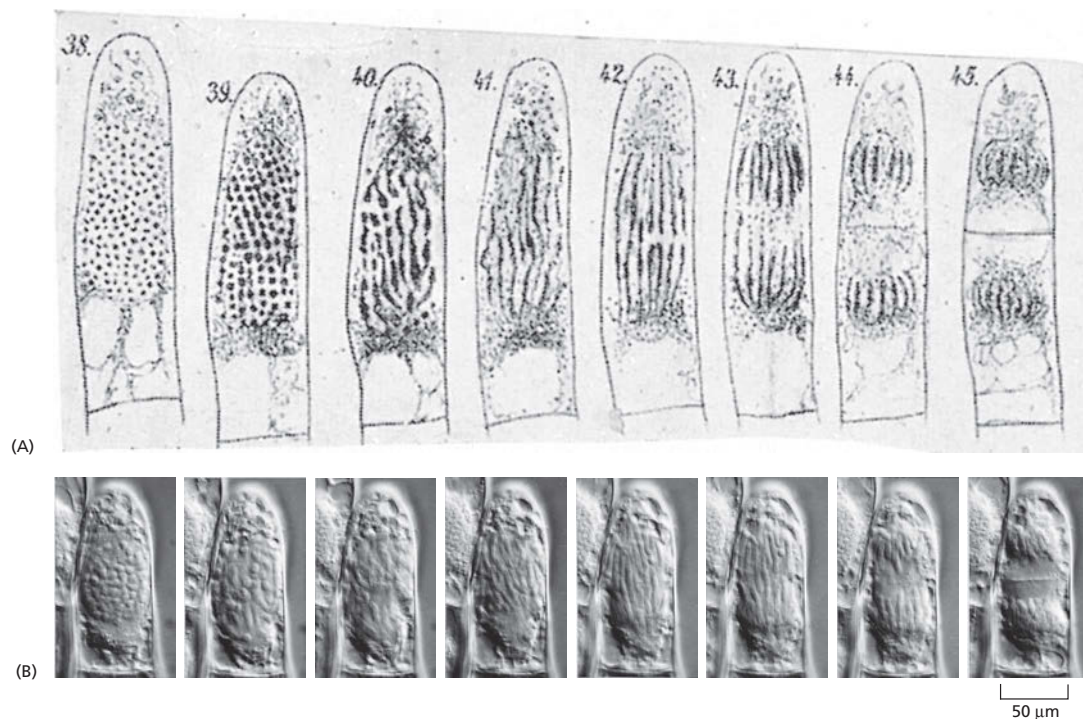



Figura 1-4 Novas células se formam pela divisão de células já existentes. (A) Em 1880, Eduard Strasburger desenhou uma célula vegetal viva (uma célula ciliada de uma flor de *Tradescantia*), a qual ele observou se dividindo em duas células-filhas durante um período de 2,5 horas. (B) Uma célula viva comparável fotografada recentemente por um microscópio óptico moderno. (B, cortesia de Peter Hepler.)

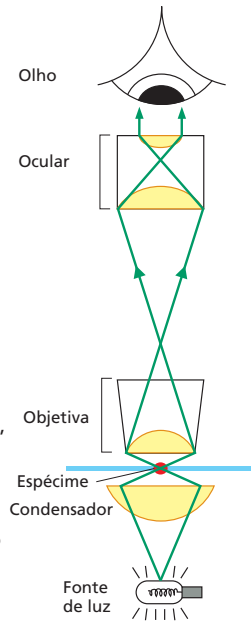
de outros microscopistas do século XIX lentamente conduziram à compreensão de que todas as células vivas eram formadas pela divisão de células existentes – um princípio algumas vezes chamado de a *teoria da célula* (**Figura 1-4**). A implicação de que organismos vivos não surgem espontaneamente, porém podem ser gerados apenas a partir de organismos existentes, foi intensamente contestada, mas foi por fim confirmada por experimentos realizados na década de 1860 por Louis Pasteur.

O princípio de que as células são geradas apenas a partir de células preexistentes e herdam suas características a partir delas fundamenta toda a biologia e dá ao assunto uma única ideia: em biologia, as questões sobre o presente estão inevitavelmente ligadas às questões sobre o passado. Para entender por que as células e os organismos de hoje se comportam dessa maneira, precisamos entender a sua história, todo o caminho de volta às origens vagas das primeiras células sobre a Terra. A teoria de Darwin sobre a evolução, publicada em 1859, forneceu a compreensão-chave que torna essa história compreensível, mostrando como a variação randômica e a seleção natural podem orientar a produção de organismos com novas características, adaptados a novos meios de vida. A teoria da evolução explica como a diversidade surgiu entre os organismos que compartilham um ancestral comum. Quando combinada com a teoria celular, ela conduz a uma visão de toda a vida, a partir do seu início até os dias atuais, como uma vasta árvore familiar de células individuais. Embora este livro aborde a maneira pela qual as células trabalham hoje, o tema evolução deverá ser abordado mais vezes.

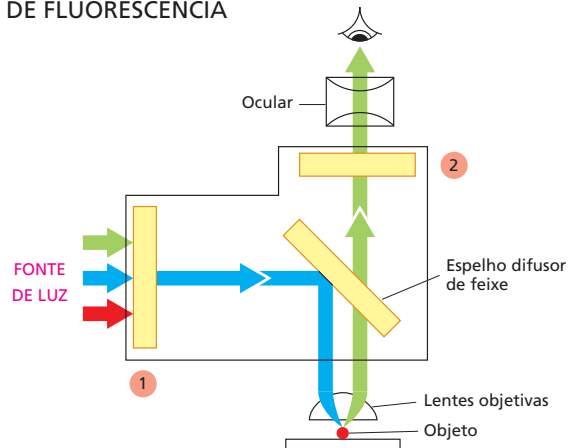
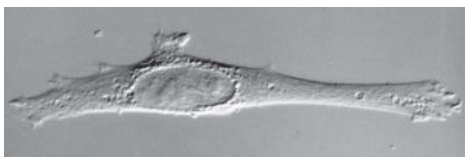
Células, organelas e até mesmo moléculas podem ser visualizadas sob o microscópio

Se você corta uma fatia muito fina de um tecido vegetal ou animal adequado e o coloca sob o microscópio óptico, você verá que o tecido está dividido em milhares de pequenas células. Essas poderão estar emaranhadas umas às outras ou separadas por uma *matriz extracelular,* um material denso frequentemente feito de fibras proteicas embutidas em um gel polissacarídico (**Figura 1-5**). Cada célula tem normalmente cerca de 5-20 μm de diâmetro (**Figura 1-6**). Se você tomou o cuidado de manter o seu espécime sob as condições certas, você verá que as

PAINEL 1-1 Microscopia

O MICROSCÓPIO ÓPTICO

O caminho da luz em um microscópio óptico

O microscópio óptico nos permite aumentar as células até 1.000 vezes e resolver detalhes tão pequenos quanto 0,2 µm (uma limitação imposta pela natureza do comprimento de onda da luz, não pela qualidade das lentes.) Três fatores são necessários para visualizar células em um microscópio óptico. Primeiro, uma luz brilhante deve ser focalizada sobre o espécime por lentes no condensador. Segundo, o espécime deve ser cuidadosamente preparado para permitir que a luz passe através dele. Terceiro, um conjunto apropriado de lentes (objetiva e ocular) deve ser arranjado para focalizar a imagem do espécime no olho.

MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Agentes fluorescentes utilizados para corar células são detectados com a ajuda de um *microscópio de fluorescência*. Esse é similar a um microscópio óptico comum, com a exceção de que a luz que ilumina é passada através de dois conjuntos de filtros. O primeiro (1) filtra a luz antes que ela alcance o espécime, passando apenas aqueles comprimentos de onda que excitam o agente fluorescente em particular. O segundo (2) repreende essa luz, e passam apenas aqueles comprimentos de onda emitidos quando o agente fluorescente emite fluorescência. Objetos corados aparecem com cor brilhante sobre um fundo escuro.

VISUALIZANDO CÉLULAS VIVAS

(A)

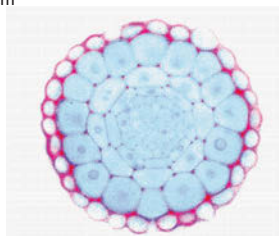
(B)

(C)

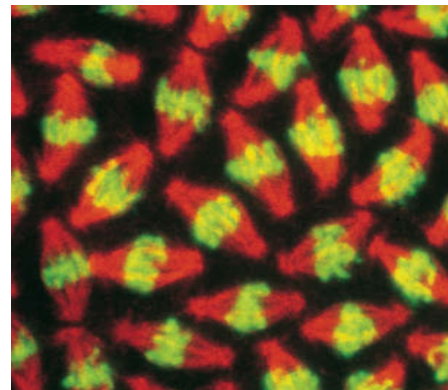
50 µm

A mesma célula animal (fibroblasto) viva não corada em cultura vista por (A) microscopia direta (campo claro); (B) microscopia de contraste de fase; (C) microscopia de contraste de interferência. Esse último sistema explora as diferenças na maneira como a luz viaja através das regiões da célula com diferentes índices de refração. Todas as três imagens podem ser obtidas no mesmo microscópio simplesmente trocando-se os componentes ópticos.

AMOSTRAS FIXADAS

A maioria dos tecidos não é suficientemente pequena nem transparente para ser examinada diretamente pelo microscópio. Portanto, em geral, eles são quimicamente fixados e cortados em fatias muito finas, ou secções, que podem ser montadas sobre uma lâmina de vidro para microscópio e subsequentemente coradas para revelar os diferentes componentes das células. Uma secção corada da ponta de uma raiz de uma planta é mostrada aqui (D). (Cortesia de Catherine Kidner.)

(D) 50 µm

SONDAS FLUORESCENTES

Os núcleos em divisão de um embrião de mosca visualizados sob um microscópio de fluorescência depois de serem corados com um agente fluorescente específico.

Agentes fluorescentes absorvem luz em um comprimento de onda e a emitem em um outro comprimento de onda mais longo. Alguns desses agentes se ligam especificamente a determinadas moléculas nas células e podem revelar a sua localização quando examinadas sob um microscópio de fluorescência. Um exemplo é o corante para DNA mostrado aqui (*verde*). Outros corantes podem ser ligados a moléculas de anticorpos, que então servem como reagentes corantes altamente específicos e versáteis que, por sua vez, se ligam seletivamente a macromoléculas específicas, permitindo-nos visualizar a sua distribuição na célula. No exemplo mostrado, uma proteína de microtúbulo no fuso mitótico está corada de vermelho com um anticorpo fluorescente. (Cortesia de William Sullivan.)

MICROSCOPIA CONFOCAL

Um microscópio confocal é um tipo especializado de microscópio de fluorescência que monta uma imagem por meio da varredura do espécime com um feixe de *laser*. Esse é focado sobre um único ponto a uma profundidade específica no espécime, e um orifício de abertura no detector permite que apenas a fluorescência emitida a partir desse mesmo seja incluída na imagem. A varredura do feixe através do espécime gera uma imagem bem-definida do plano de foco – uma secção óptica. Uma série de secções ópticas a diferentes profundidades permite que uma imagem tridimensional seja construída. Um embrião intacto de inseto é mostrado aqui corado com uma sonda fluorescente para actina (uma proteína filamentosa). (A) A microscopia convencional de fluorescência gera uma imagem borrada pela presença de estruturas fluorescentes acima e abaixo do plano de foco. (B) A microscopia confocal fornece uma secção óptica mostrando células individuais com clareza. (Cortesia de Richard Warn e Peter Shaw.)

(A)

(B)

10 μm

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

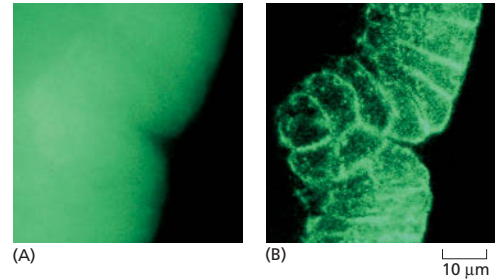
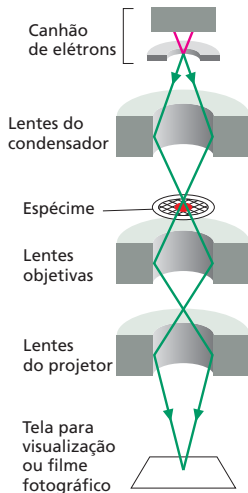
Canhão de elétrons

Lentes do condensador

Espécime

Lentes objetivas

Lentes do projetor

Tela para visualização ou filme fotográfico

Cortesia de Phillips Electron Optics, com permissão de FEI Co.

A micrografia eletrônica abaixo mostra uma pequena região de uma célula em um pedaço de testículo. O tecido foi fixado quimicamente, embutido em plástico e cortado em secções muito finas que foram coradas com sais de urânio e chumbo. (Cortesia de Daniel S. Friend.)

0,5 μm

O microscópio eletrônico de transmissão (TEM, de *transmission electron microscope*) é, em princípio, similar a um microscópio óptico, mas ele utiliza um feixe de elétrons, em vez de um feixe de luz, e bobinas magnéticas para focar o feixe, em vez das lentes de vidro. O espécime, que é colocado no vácuo, deve ser muito fino. O contraste normalmente é introduzido corando-se o espécime com metais pesados eletrondensos, que absorvem ou espalham localmente os elétrons, removendo-os do feixe à medida que passam através do espécime. O TEM tem um poder de aumento útil de até um milhão de vezes, e com espécimes biológicos pode resolver detalhes tão pequenos como cerca de 2 nm.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

No microscópio eletrônico de varredura (SEM, de *scanning electron microscope*), o espécime, que foi coberto com um filme muito fino de um metal pesado, é varrido por um feixe de elétrons focalizados no espécime pelas bobinas eletromagnéticas que, nos microscópios eletrônicos, agem como lentes. A quantidade de elétrons varridos ou emitidos à medida que o feixe bombardeia cada ponto sucessivo na superfície do espécime é medida pelo detector e é utilizada para controlar a intensidade dos pontos sucessivos em uma imagem montada na tela de vídeo. O microscópio cria imagens impressionantes de objetos tridimensionais com grande profundidade de foco e pode resolver detalhes entre 3 nm e 20 nm, dependendo do instrumento.

1 μm

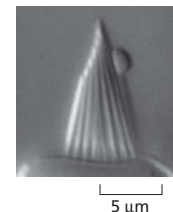
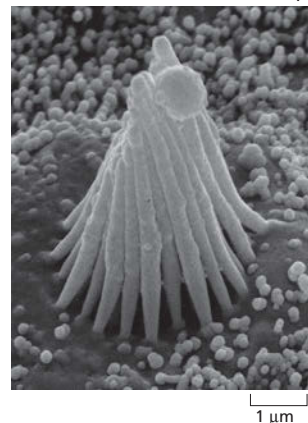
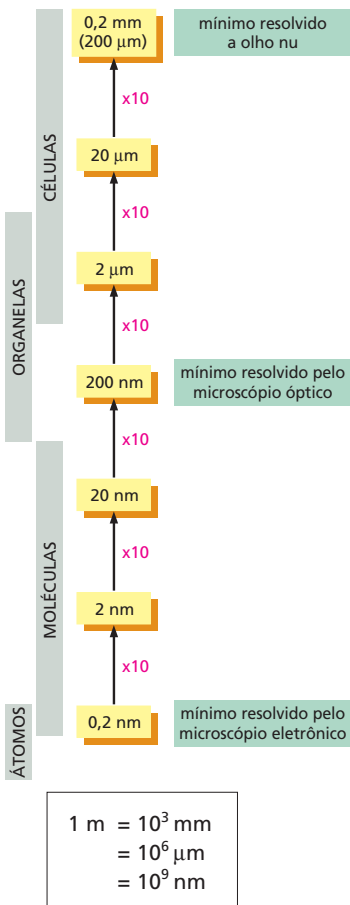
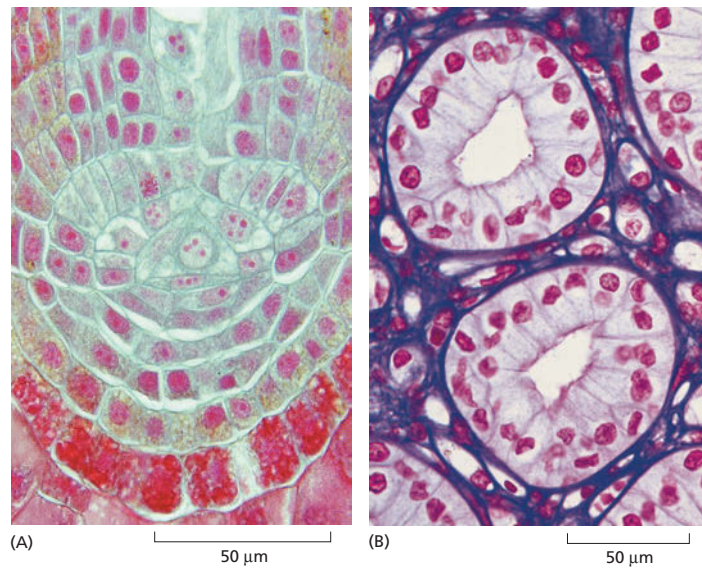
5 μm

Micrografia eletrônica de varredura do estereocílio projetando-se a partir de uma célula ciliada no interior da orelha (esquerda). Para comparar, a mesma estrutura é mostrada por microscopia óptica, no limite da sua resolução (*acima*). (Cortesia de Richard Jacobs e James Hudspeth.)

Figura 1-5 As células formam tecidos em plantas e animais. (A) Células na ponta de uma raiz de samambaia. O núcleo está corado em vermelho, e cada célula envolta por uma delgada parede celular (*azul*). (B) Células no ducto coletor de urina dos rins. Cada ducto aparece nessa secção transversal como um anel de células intimamente compactadas (com o núcleo corado em *vermelho*). O anel está envolto por matriz extracelular, corada de *púrpura*. (A, cortesia de James Mauseth; B, a partir de P.R. Wheater *et al.*, Functional Histology, 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987. Com permissão de Elsevier.)

células mostram sinais de vida: partículas se movem dando voltas dentro delas, e se você observar pacientemente, poderá ver uma célula mudar de formato lentamente e dividir-se em duas (ver Figura 1-4 e os filmes acelerados de divisões celulares de um embrião de sapo na **Animação 1.1**).

Visualizar a estrutura interna de uma célula é difícil, não apenas porque as partes são pequenas, mas também porque elas são transparentes e na maioria das vezes incolores. Uma abordagem é corar as células com agentes que coram determinados componentes de formas diferentes (ver Figura 1-5). Alternativamente, pode-se aproveitar o fato de que os componentes celulares diferem levemente um do outro no índice de refração, assim como o vidro difere no índice de refração da água, fazendo com que os raios de luz sejam defletidos à medida que passam de um meio para o outro. As pequenas diferenças no índice de refração podem tornar-se visíveis por técnicas ópticas especializadas, e as imagens resultantes podem ser melhoradas posteriormente por processamento eletrônico (ver Painel 1-1, p. 8-9).

A célula revelada desse modo tem uma anatomia distinta (**Figura 1-7**). Ela tem um limite claramente definido, indicando a presença de uma membrana que a cerca. No meio, um grande corpo redondo, o *núcleo,* está saliente. Em volta do núcleo e preenchendo o interior da célula está o **citoplasma**, uma substância transparente abarrotada com o que primeiro parece uma mistura de minúsculos objetos heterogêneos. Com um bom microscópio óptico, pode-se começar a distinguir e classificar os componentes específicos no citoplasma (Figura 1-7B). Entretanto, estruturas menores do que cerca de 0,2 μm – cerca de metade do comprimento de onda da luz visível – não podem ser resolvidas com um microscópio óptico convencional (pontos mais próximos do que isso não são distinguíveis e se parecem com um simples borrão).

Figura 1-6 O que podemos ver? Esse esquema mostra os tamanhos das células e das suas partes componentes, bem como as unidades nas quais elas são medidas.

Nos últimos anos, novos tipos de microscópios de fluorescência têm sido desenvolvidos, utilizando métodos sofisticados de iluminação e análise de imagem para visualizar alguns detalhes mais finos do que esse. Entretanto, para um maior aumento e uma melhor resolução, deve-se recorrer a um microscópio eletrônico, que pode revelar detalhes medindo poucos **nanômetros**, ou nm (ver Figura 1-6). Amostras de células para o microscópio eletrônico requerem uma preparação trabalhosa. Até mesmo para a microscopia óptica, normalmente um tecido deve ser *fixado* (isto é, preservado por imersão em uma solução química reativa) e então *embutido* em uma cera sólida ou resina, cortado ou *seccionado* em finas fatias e *corado* antes de ser visualizado. Para a microscopia eletrônica, procedimentos similares são necessários, mas os cortes devem ser bem mais finos, e não existe a possibilidade de se visualizar células vivas úmidas.

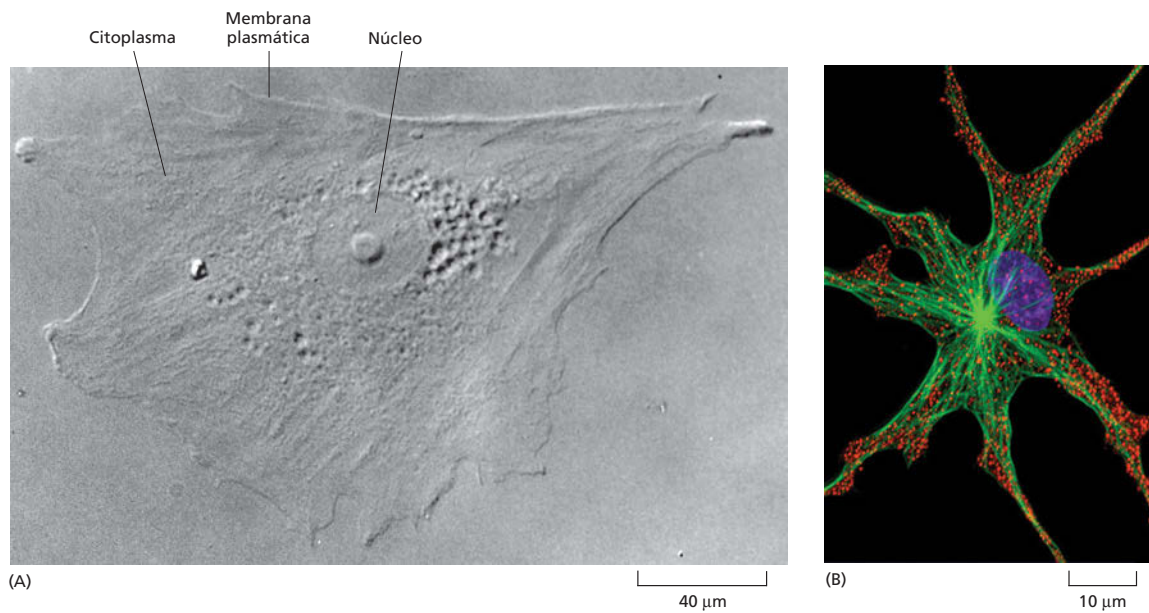



Figura 1-7 As estruturas internas de uma célula viva podem ser visualizadas sob um microscópio óptico. (A) Uma célula obtida da pele humana e crescida em cultura de tecido foi fotografada com um microscópio óptico utilizando lentes de contraste de interferência (ver Painel 1-1, p. 8-9). O núcleo está especialmente proeminente. (B) Uma célula de pigmento de um sapo, corada com corantes fluorescentes e visualizada com um microscópio confocal (ver Painel 1-1). O núcleo está mostrado em *azul*, os grânulos de pigmento, em *vermelho*, e os microtúbulos – uma classe de filamentos construídos a partir de moléculas proteicas no citoplasma –, em *verde*. (A, cortesia de Casey Cunningham; B, cortesia de Steve Rogers e do Imaging Technology Group.)

Quando as fatias finas são cortadas, coradas e colocadas no microscópio eletrônico, muito da mistura de componentes celulares se torna claramente resolvida em *organelas* distintas – estruturas separadas reconhecíveis que são apenas vagamente definidas sob o microscópio óptico. Uma delicada membrana com cerca de 5 nm de espessura é visível cercando a célula, e membranas similares formam o limite de várias organelas no interior (**Figura 1-8A, B**). A membrana externa é chamada de *membrana plasmática,* enquanto as membranas em torno das organelas são chamadas de *membranas internas.* Com um microscópio eletrônico, até mesmo algumas das grandes moléculas em uma célula podem ser visualizadas individualmente (Figura 1-8C).

O tipo de microscópio eletrônico utilizado para observar finas secções de tecido é conhecido como *microscópio eletrônico de transmissão.* Esse é, em princípio, semelhante a um microscópio óptico, exceto por transmitir um feixe de elétrons, em vez de um feixe de luz através da amostra. Outro tipo de microscópio eletrônico – o *microscópio eletrônico de varredura* – dispersa elétrons da superfície da amostra e, desse modo, é utilizado para visualizar os detalhes da superfície das células e outras estruturas (ver Painel 1-1, p. 8-9). A microscopia eletrônica permite aos biólogos visualizar as estruturas de membranas biológicas, que têm apenas duas moléculas de espessura (descrita em detalhes no Capítulo 11). Até mesmo os mais poderosos microscópios eletrônicos, entretanto, não podem revelar os átomos individuais que formam as moléculas (**Figura 1-9**).

O microscópio não é a única ferramenta que os biólogos moleculares utilizam para estudar os detalhes dos componentes celulares. Técnicas como a cristalografia por raios X, por exemplo, podem ser utilizadas para determinar a estrutura tridimensional de moléculas proteicas (discutido no Capítulo 4). Deveremos descrever outros métodos para sondar os trabalhos internos das células à medida que eles surgirem por todo o livro.

A CÉLULA PROCARIÓTICA

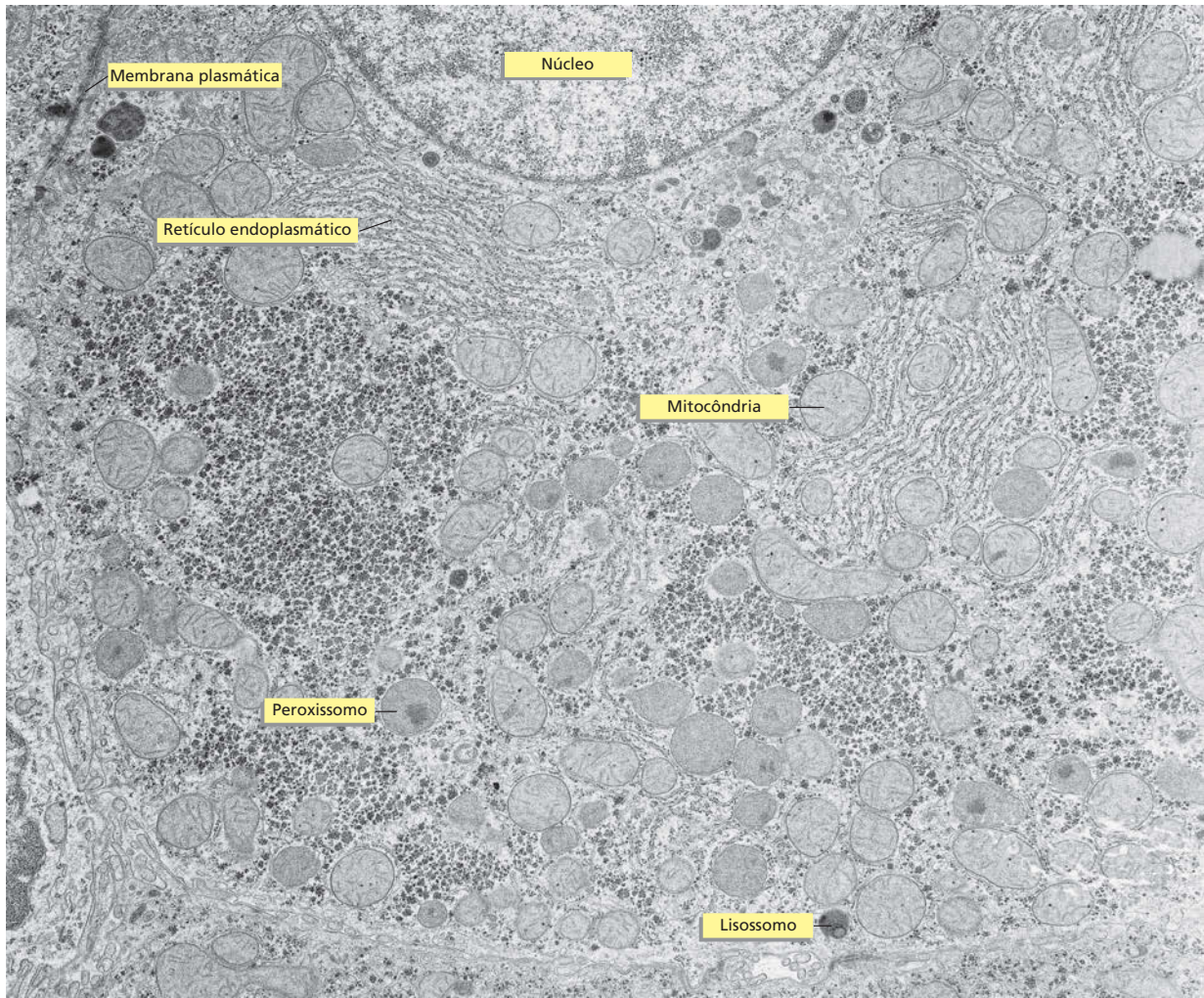
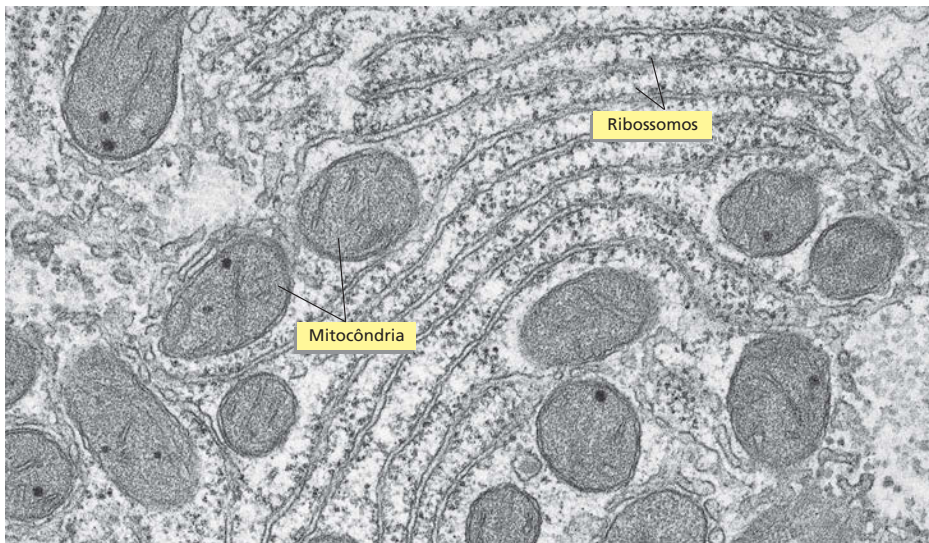
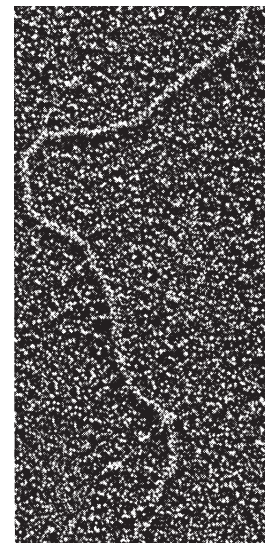
De todos os tipos de células reveladas pelo microscópio, as *bactérias* têm a estrutura mais simples e quase chegam a nos mostrar a vida desnudada até o seu âmago. As bactérias essencialmente não contêm organelas – nem mesmo um núcleo para conter o seu DNA. Essa propriedade – a presença ou ausência de um núcleo – é utilizada como base para uma classificação simples, mas fundamental para todos os organismos vivos. Os organismos cujas células têm um núcleo são

Membrana plasmática
Núcleo
Retículo endoplasmático
Mitocôndria
Peroxissomo
Lisossomo
(A)
2 μm
Ribossomos
Mitocôndria
(B)
2 μm
(C)
50 nm

Figura 1-8 (*página à esquerda*) **A estrutura fina de uma célula pode ser visualizada em um microscópio eletrônico de transmissão.** (A) Secção fina de uma célula do fígado mostrando a enorme quantidade de detalhes que são visíveis. Alguns dos componentes a serem discutidos mais adiante no capítulo estão marcados; eles são identificáveis pelo seu tamanho e forma. (B) Uma pequena região do citoplasma com um maior aumento. As estruturas menores, claramente visíveis, são os ribossomos, cada um é formado por cerca de 80-90 moléculas grandes individuais. (C) Porção de uma molécula longa de DNA em forma de cordão, isolada a partir de uma célula e vista por microscopia eletrônica. (A e B, cortesia de Daniel S. Friend; C, cortesia de Mei Lie Wong.)

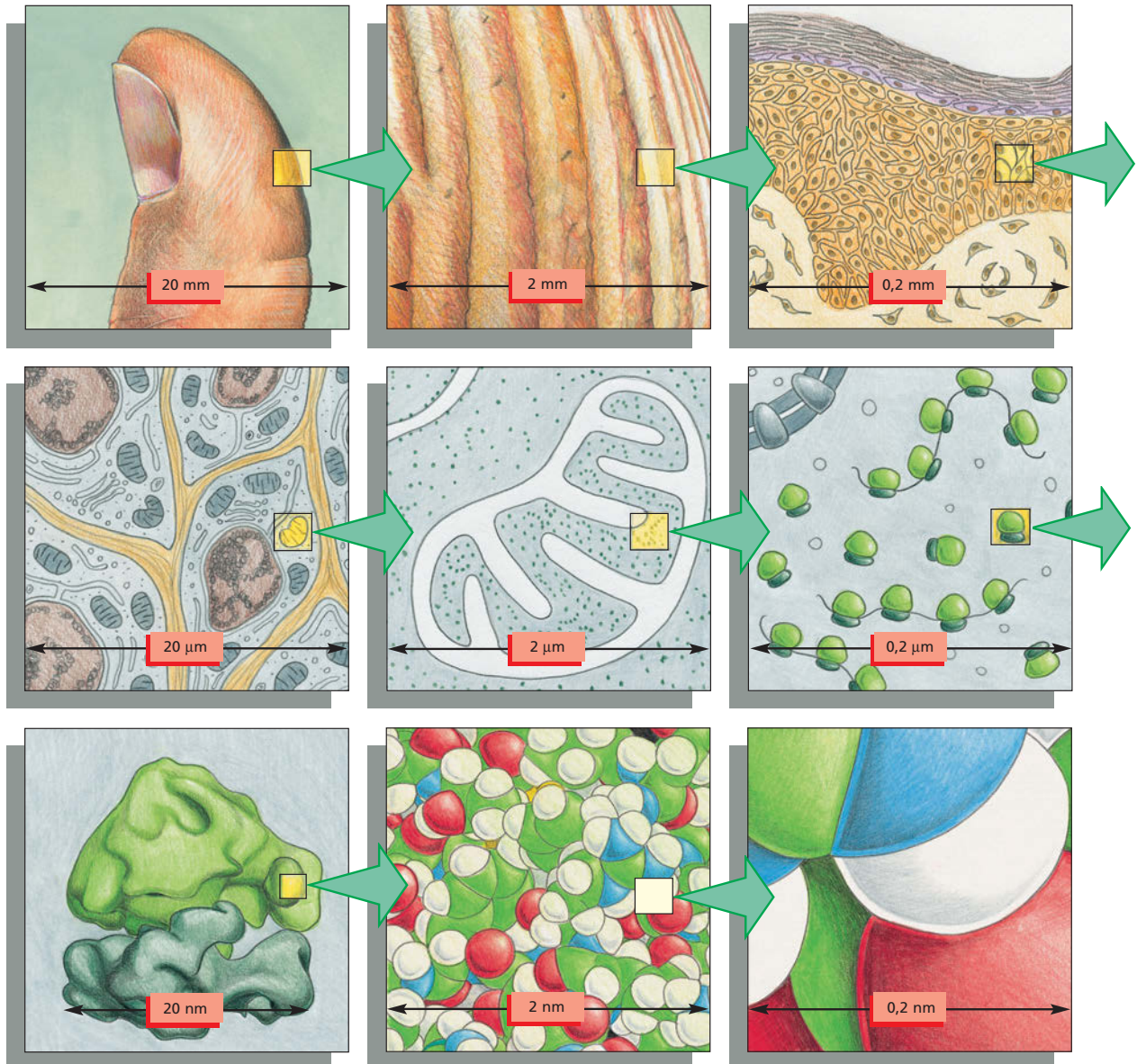
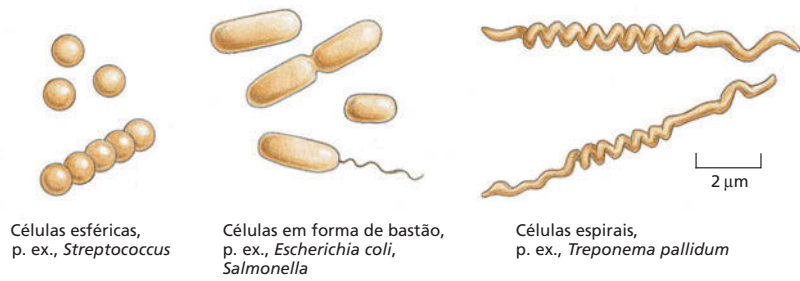



Figura 1-9 Qual o tamanho de uma célula, e qual o tamanho das suas partes? Esse diagrama transmite um sentido de escala entre células vivas e átomos. Cada painel mostra uma imagem que é então aumentada por um fator de 10 em uma progressão imaginária a partir de um dedo polegar, para a pele, para células da pele, para uma mitocôndria, passando por um ribossomo e por último até um grupo de átomos que fazem parte de uma das várias moléculas proteicas em nosso corpo. Os detalhes da estrutura molecular, como mostrado nos dois últimos painéis, estão além do poder de um microscópio eletrônico.

Figura 1-10 As bactérias se apresentam com diferentes formas e tamanhos. Bactérias típicas esféricas, em forma de bastão e espiraladas estão desenhadas em proporção. As células espirais mostradas são os organismos que causam a sífilis.

chamados de **eucariotos** (a partir das palavras gregas *eu,* significando "verdadeiro" ou "real", e *karyon,* uma "parte central" ou "núcleo"). Os organismos cujas células não têm um núcleo são chamados de **procariotos** (a partir de *pro,* significando "antes"). Os termos "bactéria" e "procarioto" são frequentemente utilizados de forma alternada, embora veremos que a categoria dos procariotos também inclui outra classe de células, as *arqueobactérias*, que são tão remotamente relacionadas às bactérias que lhes é dado um nome separado.

Os procariotos são tipicamente esféricos, semelhantes a um bastão ou em forma de um saca-rolha e pequenos – apenas uns poucos micrômetros de comprimento (Figura 1-10), embora existam algumas espécies gigantes, 100 vezes maiores do que isso. Elas frequentemente têm uma cobertura protetora resistente, chamada de parede celular, envolvendo a membrana plasmática, que envolve um único compartimento contendo o citoplasma e o DNA. Ao microscópio eletrônico, esse interior da célula normalmente aparece como uma matriz de texturas variáveis sem nenhuma estrutura interna óbvia organizada (Figura 1-11). As células se reproduzem rapidamente, dividindo-se em duas. Sob condições ótimas, quando os nutrientes são abundantes, uma célula procariótica pode duplicar-se em um espaço de tempo tão curto quanto 20 minutos. Em 11 horas, por divisões repetidas, um único procarioto pode dar origem a mais de 8 bilhões de descendentes (o que excede o número total de humanos presentes sobre a Terra). Graças ao seu grande número, velocidade de crescimento rápido e capacidade de trocar porções de material genético por um processo similar ao sexo, as populações de células procarióticas podem desenvolver-se rapidamente, adquirindo de forma rápida a capacidade de utilizar uma nova fonte de alimento ou resistir à morte por um antibiótico novo.

QUESTÃO 1-4

Uma bactéria pesa cerca de 10^{-12} g e pode dividir-se a cada 20 minutos. Se uma única célula bacteriana continuasse a dividir-se a essa velocidade, quanto tempo levaria antes que a massa de bactérias se igualasse à da Terra (6×10^{24} kg)? Compare seu resultado com o fato de que as bactérias se originaram há no mínimo 3,5 bilhões de anos e têm se dividido desde então. Explique o paradoxo aparente. (O número N de células em uma cultura no tempo t é descrito pela equação $N = N_0 \times 2^{t/G}$, onde N_0 é o número de células no tempo zero, e G é o tempo de duplicação da população.)

Nota sobre nomes biológicos

As espécies de organismos vivos são oficialmente identificadas por um par de palavras em latim normalmente escritas em itálico, semelhante ao nome e sobrenome de uma pessoa. O gênero *(Escherichia,* correspondendo ao nome) é anunciado primeiro; o segundo termo *(coli)* classifica este, identificando uma espécie em particular que pertence àquele gênero. O nome do gênero pode ser abreviado *(E. coli)* ou a classificação da espécie pode ser retirada (de modo que frequentemente falamos da mosca *Drosophila,* querendo dizer *Drosophila melanogaster).*

Os procariotos são as células mais diversas

A maioria dos procariotos vive como um organismo unicelular, embora alguns se unam para formar cadeias, grupos ou outras estruturas multicelulares organizadas. Na forma e na estrutura, os procariotos podem parecer simples e limitados, mas em termos de química eles são a classe mais diversa e criativa de células. Essas criaturas exploram uma enorme amplitude de hábitats, a partir de poças quentes de lama vulcânica até o interior de outras células vivas, e excedem muito em número outros organismos vivos na Terra. Algumas são aeróbias, utilizando oxigênio para oxidar moléculas de alimento; outras são estritamente anaeróbias e morrem à mínima exposição ao oxigênio. Como discutiremos mais adiante

Figura 1-11 A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) é mais bem compreendida a fundo do que qualquer outro organismo vivo. Uma micrografia eletrônica de uma secção longitudinal é mostrada aqui; o DNA da célula está concentrado na região levemente corada. (Cortesia de E. Kellenberger.)

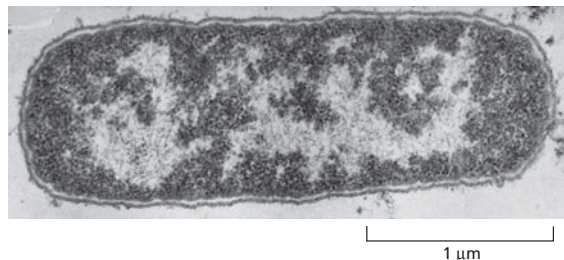
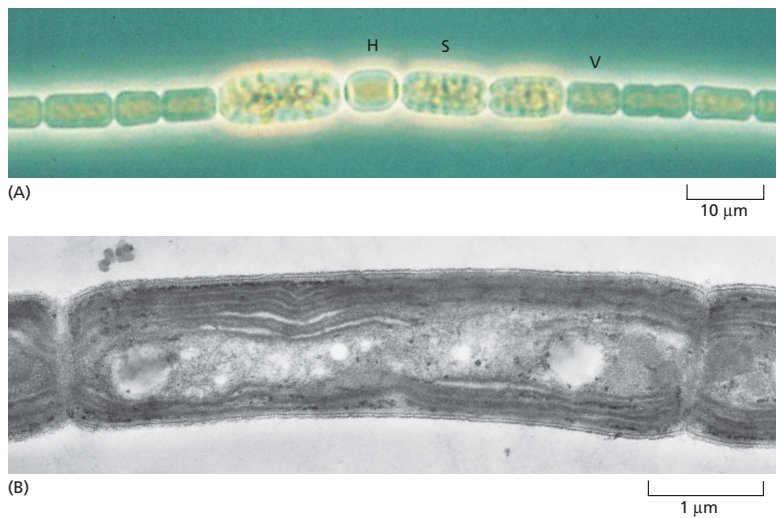



Figura 1-12 Algumas bactérias são fotossintéticas. (A) *Anabaena cylindrica* forma longos filamentos multicelulares. Essa micrografia óptica mostra células especializadas que ou fixam nitrogênio (isto é, capturam N_2 a partir da atmosfera e o incorporam nos compostos orgânicos; marcados com *H)* e fixam CO_2 (através da fotossíntese; *V*), ou desenvolvem esporos resistentes *(S)*. (B) Uma micrografia eletrônica do *Phormidium laminosum* mostra as membranas intracelulares onde a fotossíntese ocorre. Essas micrografias ilustram que até mesmo alguns procariotos podem formar organismos multicelulares simples. (A, cortesia de David Adams; B, cortesia de D. P. Hill e C. J. Howe.)

neste capítulo, acredita-se que as *mitocôndrias* – as organelas que geram energia para a célula eucariótica – tenham evoluído a partir de bactérias aeróbias que decidiram viver dentro de ancestrais anaeróbios das células eucarióticas atuais. Desse modo, nosso próprio metabolismo, com base em oxigênio, pode ser considerado como produto das atividades de células bacterianas.

Praticamente qualquer material orgânico, desde a madeira até o petróleo, pode ser utilizado como alimento por um tipo de bactéria ou outro. Ainda mais extraordinariamente, alguns procariotos podem viver inteiramente em substâncias inorgânicas: eles obtêm seu carbono a partir do CO_2 na atmosfera, seu nitrogênio a partir do N_2 atmosférico e seu oxigênio, hidrogênio, enxofre e fósforo a partir do ar, da água e de minerais inorgânicos. Algumas dessas células procarióticas, como as células de vegetais, realizam a *fotossíntese,* obtendo a energia a partir da luz solar (**Figura 1-12**); outras produzem energia a partir da reatividade química de substâncias inorgânicas no meio (**Figura 1-13**). De qualquer forma, esses procariotos realizam uma parte única e fundamental na economia da vida na Terra: outros seres vivos dependem dos compostos orgânicos que essas células geram a partir de materiais inorgânicos.

Plantas também podem capturar energia a partir da luz solar e carbono a partir do CO_2 atmosférico. Entretanto, as plantas, quando não auxiliadas pelas bactérias, não podem capturar N_2 a partir da atmosfera, e, de certa maneira, até mesmo as plantas dependem das bactérias para a fotossíntese. É quase certo que as organelas nas células vegetais que realizam a fotossíntese – os *cloroplastos* – evoluíram a partir de bactérias fotossintéticas que encontraram um lar dentro do citoplasma das células vegetais.

O mundo dos procariotos é dividido em dois domínios: Bacteria e Archaea

Tradicionalmente, todos os procariotos têm sido classificados juntos em um grande grupo. Estudos moleculares revelaram que existe uma linha divisória dentro da classe dos procariotos que a divide em dois *domínios* distintos, chamados de **Bacteria** (ou as vezes *eubactérias*) e **Archaea**. Extraordinariamente, em nível molecular, os membros desses dois domínios diferem tanto um do outro quanto dos eucariotos. A maioria dos procariotos familiares do dia a dia – as espécies que vivem no solo ou nos adoecem – são Bacteria. As Archaea não são apenas encontradas nesses hábitats, mas também em meios hostis para a maioria das outras células: existem espécies que vivem em água salgada concentrada, em fontes ácidas quentes de origem vulcânica, nos sedimentos marinhos das profundezas com pouco ar, na borra resultante do tratamento de esgotos em

Figura 1-13 Uma sulfobactéria obtém a sua energia a partir de H_2S. *Beggiatoa* – um procarioto que vive em meios com enxofre – oxida H_2S e pode fixar carbono até mesmo no escuro. Nessa micrografia óptica, depósitos amarelos de enxofre podem ser visualizados dentro das células. (Cortesia de Ralph W. Wolfe.)

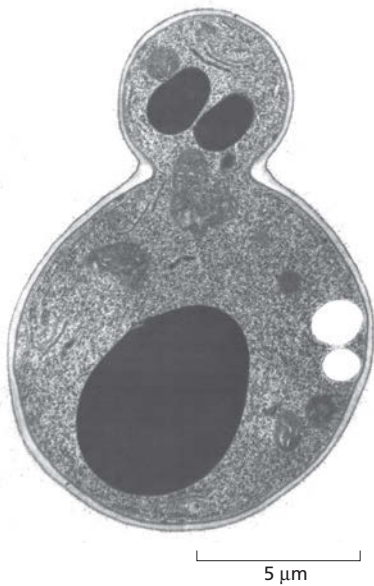



Figura 1-14 **Leveduras são eucariotos simples de vida livre.** A célula mostrada nessa micrografia eletrônica pertence à mesma espécie, *Saccharomyces cerevisae*, que faz uma rosquinha crescer e torna o suco da cevada maltado em cerveja. Ela se reproduz pela formação de brotos e depois pela divisão assimétrica em uma célula-filha grande e uma pequena. Ambas as células contêm um único núcleo (coloração escura); mas na célula-filha pequena, nesse exemplo em particular, o núcleo tem formato irregular, e o plano de secção cortou-o em duas regiões separadas. (Cortesia de Soren Mogelsvang e Natalia Gomez-Ospina.)

plantas industriais, em poças abaixo de superfícies congeladas da Antártica e no meio ácido livre de oxigênio do estômago de uma vaca, onde elas quebram a celulose e geram gás metano. Muitos desses meios lembram as condições difíceis que devem ter existido na Terra primitiva, onde os seres vivos se desenvolveram primeiro, antes que a atmosfera se tornasse rica em oxigênio.

A CÉLULA EUCARIÓTICA

Células eucarióticas, em geral, são maiores e mais elaboradas do que as Bacteria e Archaea. Algumas vivem vidas independentes, como organismos unicelulares, como as amebas e as leveduras (**Figura 1-14**); outras vivem em agrupamentos multicelulares. Todos os organismos multicelulares mais complexos – incluindo plantas, animais e fungos – são formados a partir de células eucarióticas.

Por definição, todas as células eucarióticas possuem um núcleo. Mas a posse de um núcleo significa possuir também uma variedade de outras organelas, estruturas subcelulares que realizam funções especializadas. A maioria dessas é igualmente comum a todos os organismos eucarióticos. Agora, daremos uma olhada nas principais organelas encontradas nas células eucarióticas a partir do ponto de vista das suas funções.

O núcleo é o depósito de informações da célula

O **núcleo** é normalmente a organela mais proeminente em uma célula eucariótica (**Figura 1-15**). Ele está envolvido por duas membranas concêntricas que formam o

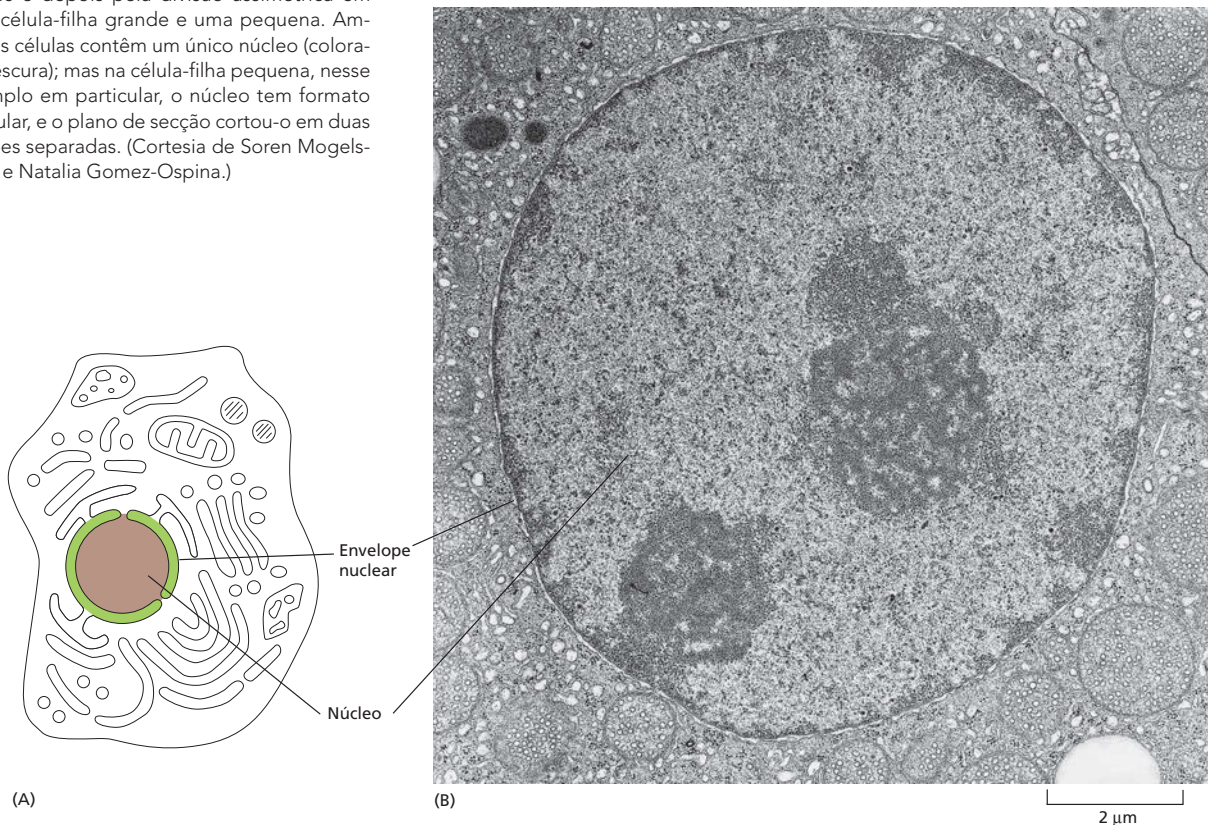



Figura 1-15 **O núcleo contém a maioria do DNA em uma célula eucariótica.** (A) Nesse desenho esquemático de uma célula animal típica – completo com o seu sistema extensivo de organelas envolvidas por membranas –, o núcleo está representado em *marrom*, o envelope nuclear, em *verde*, e o citoplasma (o interior da célula fora do núcleo), em *branco*. (B) Uma micrografia eletrônica do núcleo em uma célula de mamífero. Cromossomos individuais não são visíveis porque o DNA está disperso como finos cordões pelo núcleo nesse estágio do crescimento celular. (B, cortesia de Daniel S. Friend.)

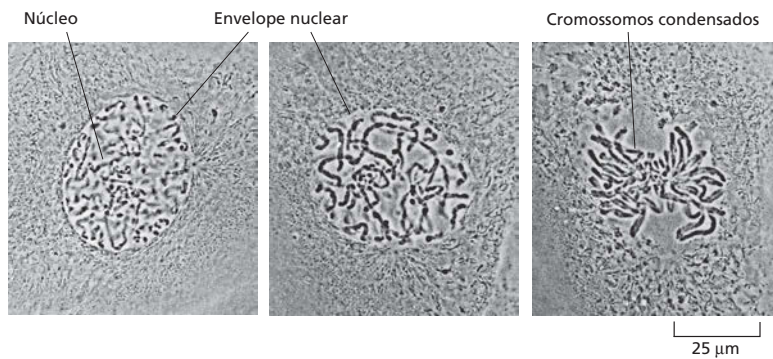



Figura 1-16 Os cromossomos se tornam visíveis quando uma célula está para se dividir. À medida que a célula se prepara para a divisão, o seu DNA se torna compactado ou condensado em cromossomos semelhantes a cordões que podem ser distinguidos ao microscópio óptico. As fotografias mostram três etapas sucessivas nesse processo em uma célula de cultura a partir do pulmão de uma salamandra aquática. (Cortesia de Conly L. Rieder.)

envelope nuclear e contém moléculas de DNA – polímeros extremamente longos que codificam as informações genéticas do organismo. Ao microscópio óptico, essas moléculas gigantes de DNA se tornam visíveis na forma de **cromossomos** individuais, quando eles se tornam mais compactos à medida que a célula se prepara para dividir-se em duas células-filhas (Figura 1-16). O DNA também armazena a informação genética nas células procarióticas; essas células não apresentam um núcleo distinto, não porque não têm DNA, mas porque elas não o mantêm dentro de um envelope nuclear, segregado do resto do conteúdo da célula.

As mitocôndrias geram energia útil a partir de nutrientes para energizar a célula

As **mitocôndrias** estão presentes em essencialmente todas as células eucarióticas e estão entre as organelas mais evidentes no citoplasma (Figura 1-17). Essas organelas têm uma estrutura muito distinta quando visualizadas sob o microscópio eletrônico: cada mitocôndria parece ter a forma de uma salsicha ou de um verme, de um a vários micrômetros de comprimento, e cada uma está envolvida em duas membranas separadas. A membrana interna é formada por dobras que se projetam para o interior da mitocôndria (Figura 1-18). As mitocôndrias contêm seu próprio DNA e se reproduzem dividindo-se em duas. Como as mitocôndrias se parecem com bactérias em vários aspectos, supõe-se que elas derivem de bactérias que foram englobadas por algum ancestral das células eucarióticas atuais (Figura 1-19). Isso, evidentemente, criou uma relação *simbiótica* – um relacionamento em que o eucarioto hospedeiro e a bactéria englobada se ajudaram para sobreviver e se reproduzir.

A observação sob o microscópio por si só dá pouca indicação sobre o que as mitocôndrias fazem. A sua função foi descoberta rompendo as células e então centrifugando a sopa de fragmentos celulares em uma centrífuga; isso separa as organelas de acordo com o seu tamanho, a sua forma e a sua densidade. As mitocôndrias purificadas foram então testadas para saber quais os processos químicos que elas poderiam realizar. Isso revelou que as mitocôndrias são geradoras de energia química para a célula. Elas aproveitam a energia a partir da oxidação de moléculas de alimento, como os açúcares, para produzir *trifosfato de adenosina,* ou ATP – o combustível químico básico que energiza a maioria das atividades das células. Como as mitocôndrias consomem oxigênio e liberam dióxido de carbono no curso das suas atividades, todo o processo é chamado de *respiração celular* – fundamentalmente, respiração em um nível celular. O processo de respiração celular será considerado com mais detalhes no Capítulo 14.

Sem as mitocôndrias, os animais, os fungos e as plantas seriam incapazes de utilizar oxigênio para extrair o máximo de quantidade de energia a partir das moléculas de alimento que as nutrem. O oxigênio seria um veneno para elas, em vez de uma necessidade essencial – isto é, elas seriam *anaeróbias*. Vários procariotos são anaeróbios, e ainda existem alguns eucariotos anaeróbios, como o parasita intestinal *Giardia*, que não possui mitocôndrias e vive apenas em meios com pouco oxigênio.

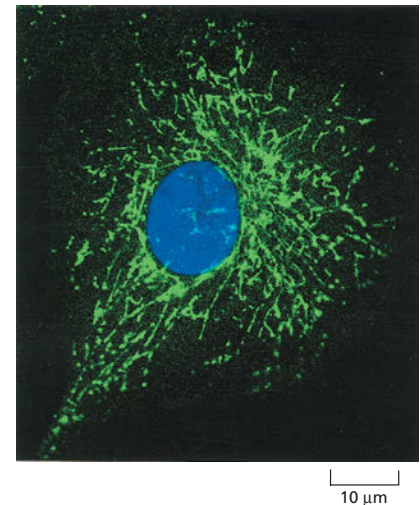



Figura 1-17 As mitocôndrias podem variar no formato. Nessa micrografia óptica de uma célula de mamífero em cultura, as mitocôndrias estão coradas em *verde* com um agente fluorescente e aparecem na forma de verme. O núcleo está corado em *azul*. As mitocôndrias são geradoras de força que oxidam moléculas de alimento para produzir energia química útil em quase todas as células eucarióticas. (Cortesia de Lan Bo Chen.)

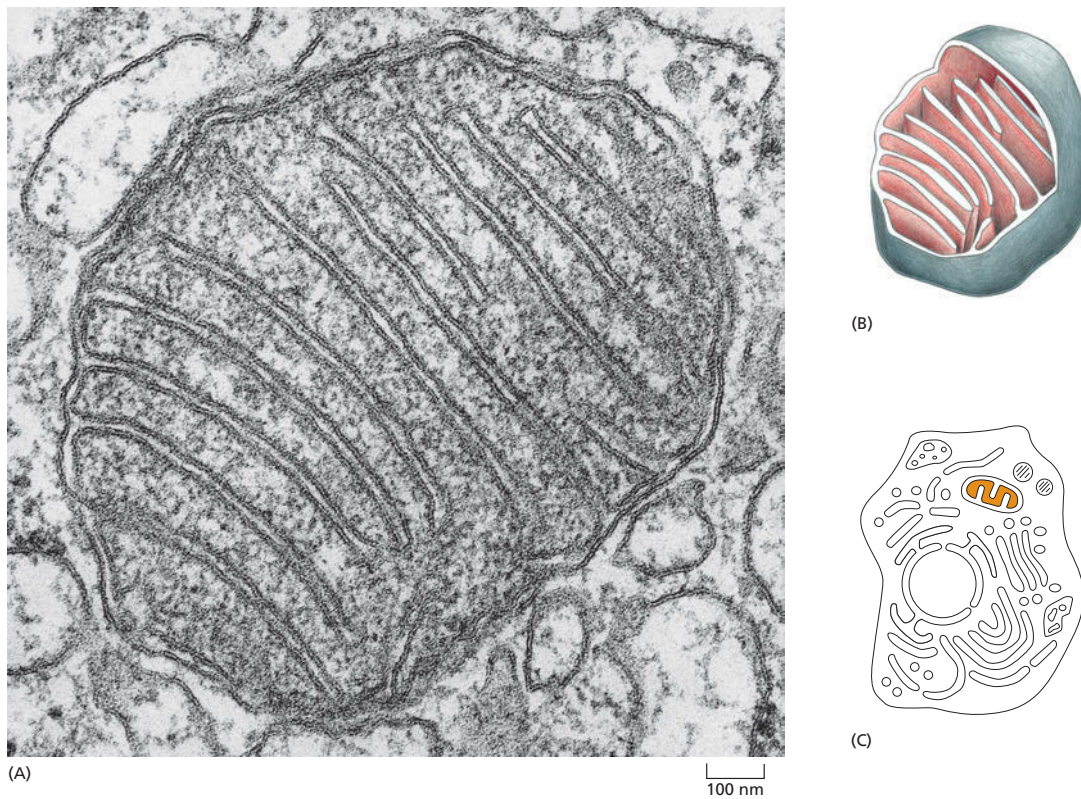



Figura 1-18 As mitocôndrias possuem uma estrutura distinta. (A) Micrografia eletrônica de um corte transversal de uma mitocôndria revela o dobramento extensivo da membrana interna. (B) Essa representação tridimensional da organização das membranas mitocondriais mostra a membrana externa lisa e a membrana interna muito convoluta. A membrana interna contém a maioria das proteínas responsáveis pela respiração celular, e ela é altamente dobrada para fornecer uma grande área de superfície para a sua atividade. (C) Nessa célula esquemática, o espaço interior da mitocôndria está corado. (A, cortesia de Daniel S. Friend.)

Os cloroplastos capturam energia a partir da luz solar

Os **cloroplastos** são grandes organelas verdes encontradas apenas nas células de vegetais e algas, e não nas células de animais ou fungos. Essas organelas têm uma estrutura ainda mais complexa do que a das mitocôndrias: além das duas membranas que as envolvem, os cloroplastos possuem pilhas internas de membranas contendo o pigmento verde *clorofila* (**Figura 1-20**). Quando uma planta é mantida no escuro, a sua cor verde desbota; quando colocada de volta na luz, a sua cor verde retorna. Isso sugere que a clorofila e os cloroplastos que a contêm sejam cruciais para o relacionamento especial que as plantas e algas têm com a luz. Contudo, o que é esse relacionamento?

Todos os animais e plantas necessitam de energia para viver, crescer e reproduzir. Os animais apenas podem utilizar a energia química que eles obtêm

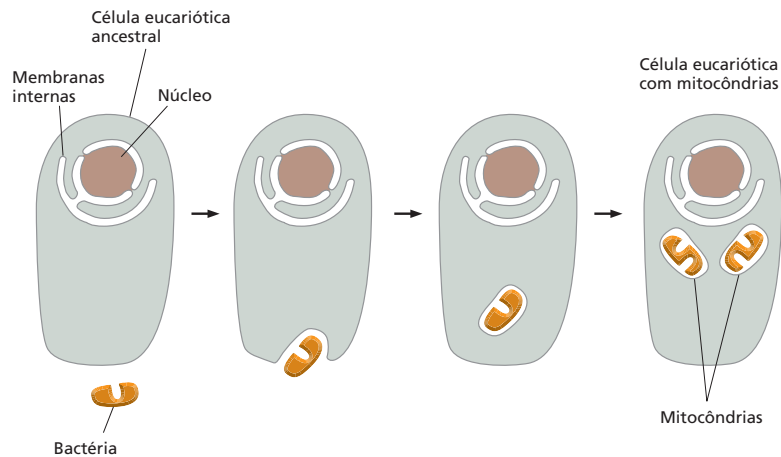



Figura 1-19 As mitocôndrias provavelmente se desenvolveram a partir de bactérias englobadas. É praticamente certo que as mitocôndrias se originaram a partir de bactérias que foram englobadas por uma célula eucariótica ancestral e sobreviveram dentro dela, vivendo em simbiose com o seu hospedeiro.

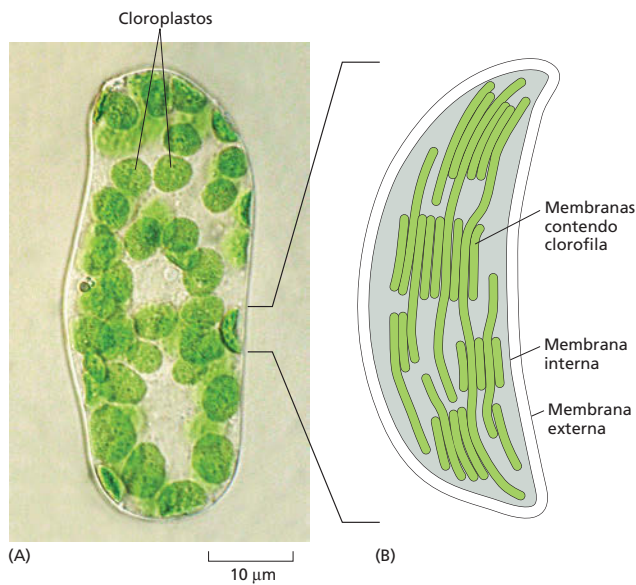



Figura 1-20 Os cloroplastos capturam a energia da luz solar nas células vegetais. (A) Uma única célula isolada da folha de uma angiosperma, vista sob um microscópio óptico, mostrando vários cloroplastos verdes. (B) Desenho de um dos cloroplastos mostrando o sistema de membranas internas bastante dobrado contendo as moléculas verdes de clorofila que absorvem a energia luminosa. (A, cortesia de Preeti Dahiya.)

se alimentando de produtos de outros seres vivos. As plantas podem obter a sua energia diretamente a partir da luz solar, e os cloroplastos são as organelas que as permitem fazer isso. A partir do ponto de vista da vida na Terra, os cloroplastos realizam uma tarefa até mesmo mais essencial do que as mitocôndrias: eles realizam a fotossíntese – isto é, eles capturam a energia da luz solar em moléculas de clorofila e utilizam essa energia para conduzir a fabricação de moléculas de açúcar ricas em energia. No processo, eles liberam oxigênio como um subproduto molecular. Então, as células vegetais podem extrair essa energia química armazenada quando necessitarem pela oxidação desses açúcares nas suas mitocôndrias, exatamente como as células animais. Dessa forma, os cloroplastos geram tanto as moléculas de alimento como o oxigênio que todas as mitocôndrias utilizam. Como eles o fazem será explicado no Capítulo 14.

Assim como as mitocôndrias, os cloroplastos contêm o seu próprio DNA, reproduzem-se dividindo-se em dois, e supõe-se que se tenham desenvolvido a partir de bactérias – nesse caso, a partir de bactérias fotossintéticas que foram de algum modo englobadas por células eucarióticas primitivas (**Figura 1-21**).

Membranas internas criam compartimentos intracelulares com diferentes funções

Núcleo, mitocôndrias e cloroplastos não são as únicas organelas envolvidas por membranas dentro das células eucarióticas. O citoplasma contém uma abun-

QUESTÃO 1-5

De acordo com a Figura 1-19, por que as mitocôndrias têm tanto uma membrana externa como uma interna? Qual das duas membranas mitocondriais deveria ser – em termos evolucionários – derivada a partir da membrana celular da célula eucariótica ancestral? Na micrografia eletrônica de uma mitocôndria na Figura 1-18A, identifique o espaço que contém o DNA mitocondrial, isto é, o espaço que corresponde ao citosol da bactéria que foi internalizada pela célula eucariótica ancestral mostrada na Figura 1-19.

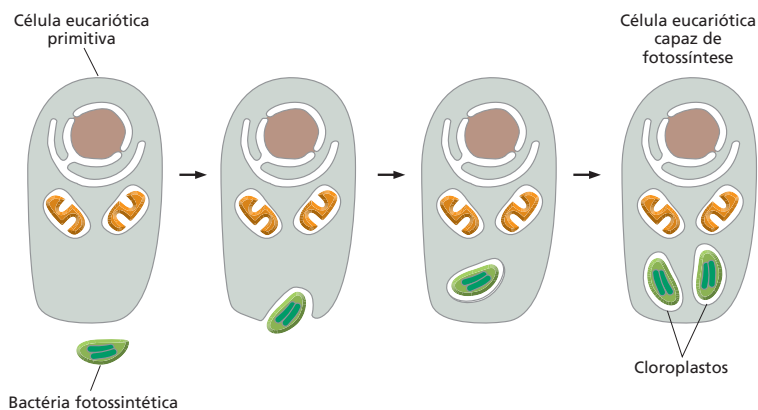
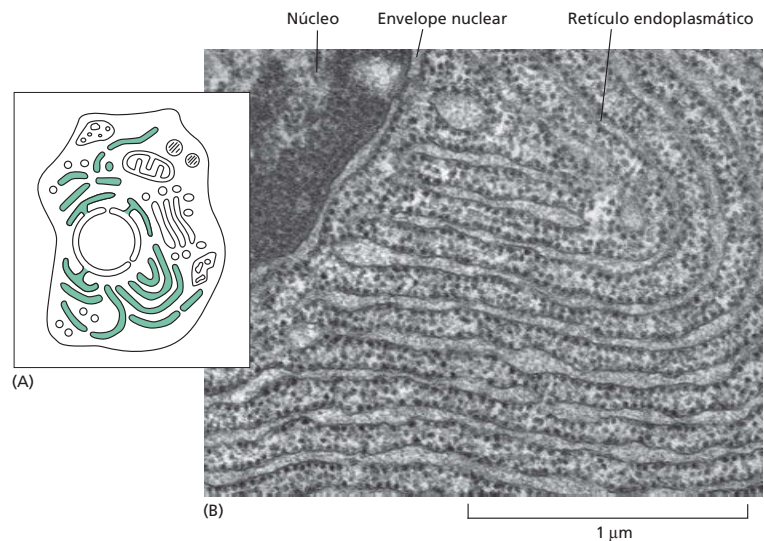



Figura 1-21 Os cloroplastos provavelmente se desenvolveram a partir de bactérias engolfadas. Supõe-se que os cloroplastos se originaram a partir de bactérias fotossintéticas simbiontes, as quais foram captadas por células eucarióticas primitivas que já continham mitocôndrias.

Figura 1-22 Vários componentes celulares são produzidos no retículo endoplasmático. (A) Diagrama esquemático de uma célula animal mostra o retículo endoplasmático (RE) em *verde*. (B) Micrografia eletrônica de uma secção fina de uma célula pancreática de mamífero mostra uma pequena parte do RE, do qual existem vastas áreas nesse tipo de célula, que é especializada em secreção de proteínas. Note que o RE é contínuo com a membrana do envelope nuclear. As partículas pretas espalhadas por esta região particular do RE mostradas aqui são os ribossomos – os agrupamentos moleculares que realizam a síntese proteica. Por causa da sua aparência, o RE coberto por ribossomos é frequentemente chamado de "RE rugoso". (B, cortesia de Lelio Orci.)

dância de outras organelas – a maioria delas envolvida por membranas simples – que realizam várias funções distintas. A maioria dessas estruturas está envolvida com a capacidade das células de importar matéria-prima e exportar substâncias manufaturadas e produtos inúteis. Algumas dessas organelas envolvidas por membranas estão muito aumentadas nas células que são especializadas pela secreção de proteínas; outras são particularmente numerosas em células especializadas na digestão de corpos estranhos.

O *retículo endoplasmático (RE)* – um labirinto irregular de espaços interconectados envolvido por uma membrana (**Figura 1-22**) – é o local no qual a maioria dos componentes da membrana celular, assim como materiais destinados à exportação a partir da célula, é sintetizada. Pilhas de sacos achatados envolvidos por membranas constituem o *aparelho de Golgi* (**Figura 1-23**), que recebe e com

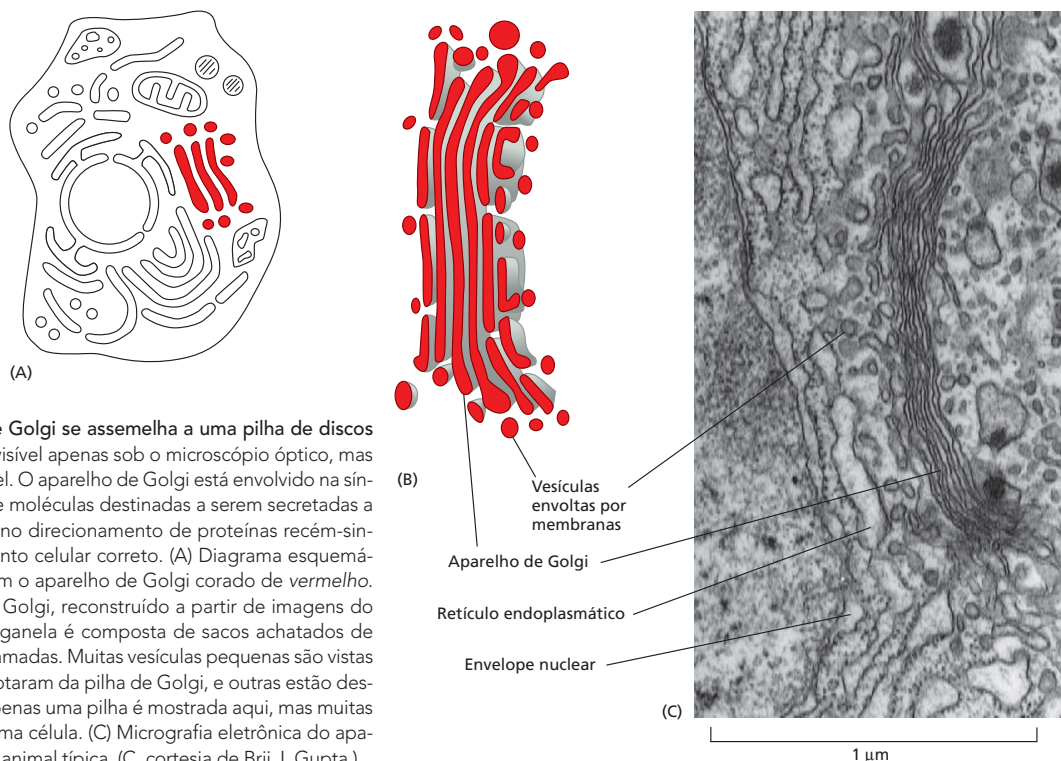



Figura 1-23 O aparelho de Golgi se assemelha a uma pilha de discos achatados. Essa organela é visível apenas sob o microscópio óptico, mas frequentemente imperceptível. O aparelho de Golgi está envolvido na síntese e no empacotamento de moléculas destinadas a serem secretadas a partir da célula, assim como no direcionamento de proteínas recém-sintetizadas para o compartimento celular correto. (A) Diagrama esquemático de uma célula animal com o aparelho de Golgi corado de *vermelho*. (B) Desenho do aparelho de Golgi, reconstruído a partir de imagens do microscópio eletrônico. A organela é composta de sacos achatados de membrana empilhados em camadas. Muitas vesículas pequenas são vistas próximas; algumas dessas brotaram da pilha de Golgi, e outras estão destinadas a fusionar-se a ela. Apenas uma pilha é mostrada aqui, mas muitas podem estar presentes em uma célula. (C) Micrografia eletrônica do aparelho de Golgi de uma célula animal típica. (C, cortesia de Brij J. Gupta.)

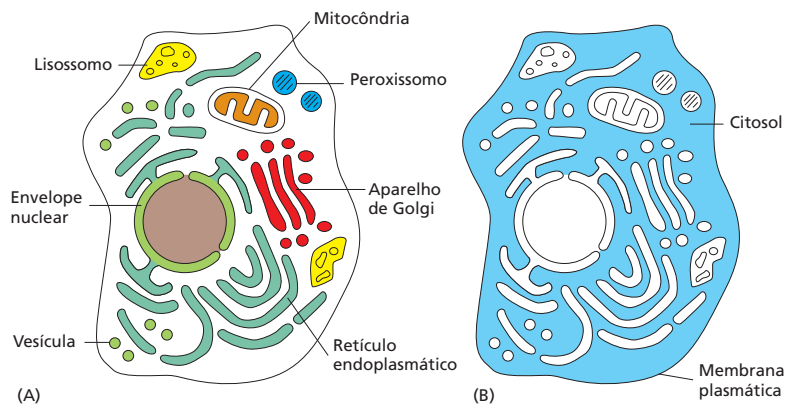



Figura 1-24 Organelas envolvidas por membrana estão distribuídas pelo citoplasma. (A) Existe uma variedade de compartimentos envolvidos por membrana dentro das células eucarióticas, cada uma especializada em realizar uma função diferente. (B) O restante da célula, excluindo todas essas organelas, é chamado de citosol (marcado de *azul*).

frequência modifica quimicamente as moléculas sintetizadas no RE e então as direcionam para o exterior da célula ou para vários outros locais dentro da célula. Os *lisossomos* são organelas pequenas de forma irregular nas quais ocorre a digestão intracelular, liberando nutrientes a partir de partículas de alimento e degradando moléculas indesejáveis para reciclagem ou excreção. Os *peroxissomos* são pequenas vesículas envolvidas por membranas que fornecem um meio abrangente de reações nas quais o peróxido de hidrogênio, um composto perigosamente reativo, é gerado e degradado. As membranas também formam vários tipos diferentes de pequenas *vesículas* envolvidas no transporte de materiais entre uma organela envolvida por membrana e outra organela. Todo esse sistema de organelas relacionadas está esquematizado na **Figura 1-24A**.

Uma troca contínua de materiais ocorre entre o RE, o aparelho de Golgi, os lisossomos e o exterior da célula. A troca é mediada por pequenas vesículas envolvidas por membrana que brotam a partir da membrana de uma organela e se fusionam com outra, como minúsculas bolhas de sabão que brotam e depois se unem em bolhas maiores. Na superfície da célula, por exemplo, porções da membrana plasmática se dobram para dentro e se desgrudam para formar vesículas que transportam material capturado, a partir do meio externo, para dentro da célula (**Figura 1-25**). Essas vesículas se fusionam com os endossomos envoltos por membranas, que maturam em lisossomos, onde o material importado é digerido. Células animais podem englobar partículas muito grandes ou até mesmo células estranhas inteiras por esse processo de *endocitose.* O processo reverso, *exocitose,* pelo qual as vesículas do interior da célula se fusionam com a membrana plasmática e liberam seus conteúdos para o meio externo, também é uma atividade celular comum (ver Figura 1-25). A maioria dos hormônios, neurotransmissores e outras moléculas de sinalização são secretados a partir das células por exocitose. Como as organelas envolvidas por membrana transportam proteínas e outras moléculas a partir de um local para outro dentro da célula será discutido com mais detalhes no Capítulo 15.

Figura 1-25 As células se dedicam à endocitose e à exocitose. As células podem importar materiais a partir do meio externo, capturando-os em vesículas que se originam a partir da membrana plasmática. Finalmente, as vesículas se fundem com lisossomos, onde ocorre a digestão intracelular. Por um processo oposto, as células exportam materiais que elas sintetizaram no RE e no aparelho de Golgi: os materiais são armazenados em vesículas intracelulares e liberados para o exterior, quando essas vesículas se fusionam com a membrana plasmática.

O citosol é um gel aquoso concentrado, formado de moléculas grandes e pequenas

Se conseguíssemos retirar a membrana plasmática de uma célula eucariótica e então remover todas as suas organelas envolvidas por membranas, incluindo o núcleo, o RE, o aparelho de Golgi, as mitocôndrias e os cloroplastos, ficaríamos com o **citosol** (ver Figura 1-24B). Em outras palavras, o citosol é a parte do citoplasma que não é dividida por membranas intracelulares. Na maioria das células, o citosol é o maior compartimento único. Ele contém um grande número de moléculas grandes e pequenas, amontoadas tão intimamente que ele se comporta mais como um gel à base de água do que como uma solução líquida (**Figura 1-26**). Ele é o local de várias reações químicas fundamentais para a existência da célula. As primeiras etapas na quebra de moléculas nutrientes ocorrem no citosol, por exemplo, e também

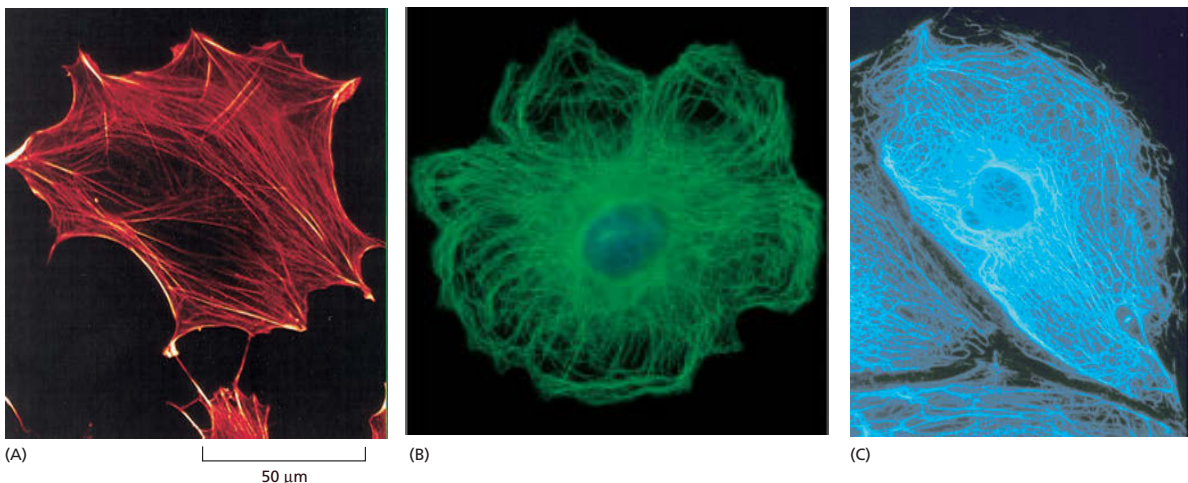
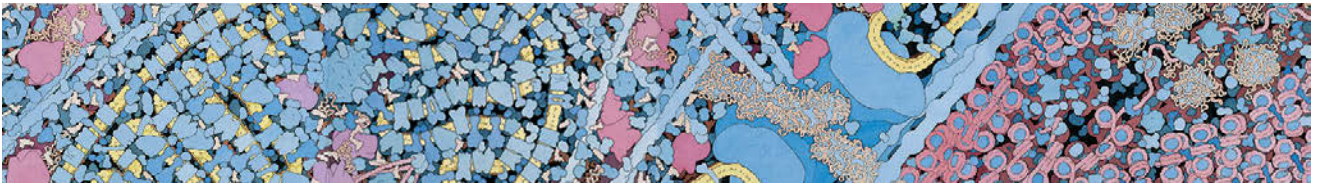
Figura 1-26 **O citoplasma é recheado com organelas e uma grande quantidade de moléculas grandes e pequenas.** Esse desenho esquemático, com base nos tamanhos e nas concentrações conhecidas de moléculas no citosol, mostra o quão recheado é o citoplasma. O panorama inicia na esquerda na superfície de uma célula; desloca-se pelo RE, aparelho de Golgi e por uma mitocôndria, e termina na direita no núcleo. Note que alguns ribossomos (objetos cor-de-rosa grandes) estão livres no citosol, e outros estão ligados ao RE. (Cortesia de D. Goodsell.)

é nele que a célula realiza um dos seus processos de síntese chave – a manufatura de proteínas. Os **ribossomos** – as máquinas moleculares que fazem as moléculas proteicas – são visíveis sob o microscópio eletrônico como pequenas partículas no citosol, frequentemente ligadas à face citosólica do RE (ver Figuras 1-8B e 1-22B).

O citoesqueleto é responsável pelos movimentos celulares direcionados

O citoplasma não é apenas uma sopa de compostos e organelas sem estrutura. Sob o microscópio eletrônico, pode-se ver que nas células eucarióticas o citosol é cruzado por filamentos longos e finos de proteínas. Frequentemente, os filamentos podem ser vistos ancorados por uma extremidade à membrana plasmática ou irradiando para fora a partir de um local central adjacente ao núcleo. Esse sistema de filamentos é chamado de **citoesqueleto** (Figura 1-27). Os filamentos mais finos são os *filamentos de actina,* que estão presentes em todas as células eucarióticas, mas ocorrem especialmente em grande número dentro das células musculares, onde servem como parte da maquinaria que gera forças contráteis. Os filamentos mais grossos são chamados de *microtúbulos,* porque eles têm a forma de diminutos tubos ocos. Eles se reorganizam em disposições espetaculares nas células em divisão, ajudando a puxar os cromossomos duplicados em direções opostas e distribuindo-os igualmente para as duas células-filhas (Figura 1-28). Intermediários na espessura, entre os filamentos de actina e os microtúbulos, estão os *filamentos intermediários* que servem para fortalecer a célula mecanicamente. Esses três tipos de filamentos, junto com outras proteínas que se ligam a eles, formam um sistema de vigas, de cabos e de motores que dão à célula o seu reforço mecânico, controlam o seu formato e dirigem e guiam seus movimentos (ver Animação 1.2 e Animação 1.3).

Como o citoesqueleto governa a organização interna da célula, assim como as suas características externas, ele se torna necessário para a célula vegetal – contida em uma espécie de caixa delimitada por uma parede resistente de matriz celular – como o é para uma célula animal que se dobra, estica, nada ou arrasta livremente. Em uma célula vegetal, por exemplo, organelas como as mitocôndrias são orientadas por uma corrente constante pelo interior celular ao longo das trilhas citoesqueléticas. As células animais e as células vegetais

Figura 1-27 **O citoesqueleto é uma rede de filamentos que cruzam o citoplasma de uma célula eucariótica.** Os filamentos feitos de proteínas fornecem a todas as células eucarióticas uma moldura interna que ajuda a organizar as atividades internas da célula e a sustentar seus movimentos e suas mudanças de formato. Diferentes tipos de filamentos podem ser detectados utilizando-se diferentes agentes fluorescentes. Aqui estão (A) os filamentos de actina, (B) os microtúbulos e (C) os filamentos intermediários. (A, cortesia de Simon Barry e Chris D'Lacey; B, cortesia de Nancy Kedersha; C, cortesia de Clive Lloyd.)

dependem também do citoesqueleto para separar seus componentes internos em dois conjuntos-filhos durante a divisão celular. O seu papel na divisão celular pode ser a função mais antiga do citoesqueleto; até mesmo as bactérias possuem proteínas que estão relacionadas de forma distante com aquelas dos filamentos de actina e dos microtúbulos eucarióticos e com aquelas que formam filamentos que têm um papel na divisão da célula procariótica. Examinaremos o citoplasma com detalhes no Capítulo 17 e discutiremos seu papel na divisão celular no Capítulo 18, e suas respostas a sinais a partir da metade no Capítulo 16.

O citoplasma está longe de ser estático

O interior da célula está em constante movimento. O citoesqueleto é uma selva dinâmica de cordas e varas que estão continuamente sendo amarradas e separadas; seus filamentos podem agrupar-se e depois desaparecer em questão de minutos. Ao longo dessas trilhas e cabos, as organelas e vesículas aceleram para frente e para trás, correndo de um lado para outro da célula em uma fração de segundo. O RE e as moléculas que preenchem cada espaço livre estão em agitação térmica frenética – com proteínas não ligadas zunindo ao redor tão rapidamente, que, mesmo se movimentando ao acaso, elas visitam cada canto da célula em poucos segundos, colidindo constantemente como uma tempestade de poeira de moléculas orgânicas menores.

Nem a natureza alvoroçada do interior da célula nem os detalhes da estrutura da célula foram apreciados quando cientistas olharam pela primeira vez as células por um microscópio; nossa compreensão sobre a estrutura da célula foi se acumulando lentamente. Algumas das descobertas-chave estão listadas na **Tabela 1-1**. O **Painel 1-2** resume as diferenças entre as células animais, vegetais e bacterianas.

QUESTÃO 1-6

Sugira por que seria vantajoso para as células eucarióticas desenvolverem sistemas internos elaborados de membranas que as permitem importar substâncias a partir do exterior, como mostrado na Figura 1-25.

QUESTÃO 1-7

Discuta as vantagens e desvantagens relativas da microscopia óptica e eletrônica. Como você poderia visualizar melhor (a) uma célula viva da pele, (b) uma mitocôndria de levedura, (c) uma bactéria e (d) um microtúbulo?

As células eucarióticas podem ter-se originado como predadoras

As células eucarióticas são tipicamente 10 vezes o comprimento e 1.000 vezes o volume das células procarióticas (embora exista uma grande variação de tamanho dentro de cada categoria). Além disso, elas possuem uma coleção inteira de características – um citoesqueleto, mitocôndrias e outras organelas – que as separam das Bacteria e Archaea.

Figura 1-28 **Os microtúbulos ajudam a distribuir os cromossomos em uma célula em divisão.** Quando uma célula se divide, o seu envelope nuclear se rompe, e o seu DNA se condensa em pares de cromossomos visíveis, que são puxados pelos microtúbulos para células separadas. Nessa micrografia eletrônica de transmissão, os microtúbulos se irradiam a partir de um foco em extremidades opostas da célula em divisão. (Fotomicrografia cortesia de Conly L. Rieder.)

TABELA 1-1 Marcos históricos na determinação da estrutura celular

1665	Hooke utiliza um microscópio primitivo para descrever os pequenos poros em cortes de cortiça que ele chamou de **"células"**.
1674	Leeuwenhoek reporta a sua descoberta dos **protozoários**. Nove anos mais tarde, ele viu **bactérias** pela primeira vez.
1833	Brown publica as suas observações ao microscópio de orquídeas, descrevendo claramente o **núcleo** da célula.
1838	Schleiden e Schwann propõem a **teoria da célula**, estabelecendo que a célula nucleada é o bloco universal de construção de tecidos vegetais e animais.
1857	Kölliker descreve a **mitocôndria** em células musculares.
1879	Flemming descreve com clareza o **comportamento dos cromossomos durante a mitose** em células animais.
1881	Cajal e outros histologistas desenvolvem métodos de coloração que revelam a estrutura das **células nervosas** e a organização do tecido neuronal.
1898	Golgi vê pela primeira vez e descreve o **aparelho de Golgi** pela coloração de células com nitrato de prata.
1902	Boveri associa **cromossomos e hereditariedade** pela observação do comportamento dos cromossomos durante a reprodução sexuada.
1952	Palade, Porter e Sjöstrand desenvolvem métodos de **microscopia eletrônica** que permitiram que várias estruturas intracelulares fossem visualizadas pela primeira vez. Em uma das primeiras aplicações dessas técnicas, Huxley mostra que o músculo contém arranjos de filamentos de proteínas – a primeira evidência do **citoesqueleto**.
1957	Robertson descreve a estrutura de bicamada da **membrana celular**, vista pela primeira vez ao microscópio eletrônico.
1960	Kendrew descreve detalhadamente a primeira **estrutura proteica** (**mioglobina** de espermatozoide de baleia) a uma resolução de 0,2 nm utilizando **cristalografia por raios X**. Perutz propõe uma estrutura para a **hemoglobina** a uma resolução menor.
1965	Christian de Duve e seus colegas utilizam a técnica de fracionamento celular para separar os **peroxissomos**, as **mitocôndrias** e os **lisossomos** a partir de uma preparação de fígado de rato.
1968	Petran e colaboradores constroem o primeiro **microscópio confocal**.
1974	Lazarides e Weber desenvolvem o uso de **anticorpos fluorescentes** para corar o citoesqueleto.
1994	Chalfie e colaboradores introduzem a **proteína fluorescente verde** (**GFP**) como um marcador para acompanhar o comportamento das proteínas nas células vivas.

Quando e como os eucariotos desenvolveram esses sistemas permanece um mistério. Embora Eukarya, Bacteria e Archaea tenham divergido um dos outros muito cedo na história da vida na Terra (discutido no Capítulo 14), os eucariotos não adquiriram todas as suas características distintas no mesmo momento (**Figura 1-29**). De acordo com uma teoria, a célula eucariótica ancestral era um predador que se alimentava pela captura de outras células. Um tipo de vida desses requer um grande tamanho, uma membrana flexível e um citoesqueleto para ajudar na movimentação e na alimentação da célula. O compartimento nuclear pode ter-se desenvolvido para manter o DNA separado do seu tumulto físico e químico, assim como para permitir um controle mais delicado e complexo de como a célula lê sua informação genética.

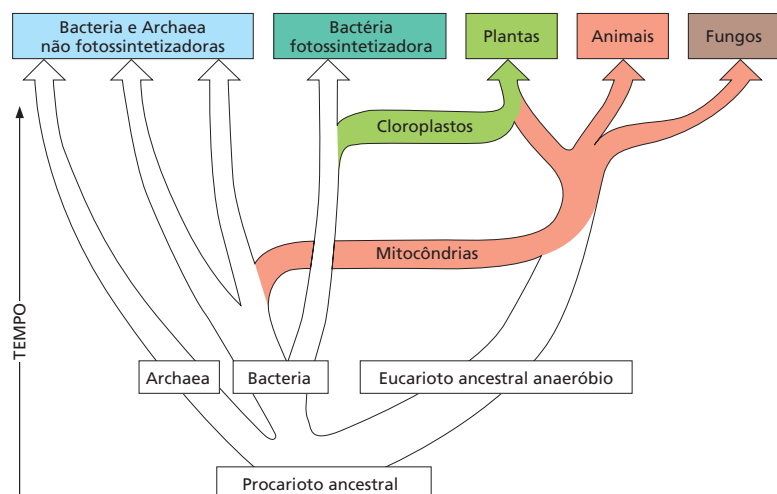
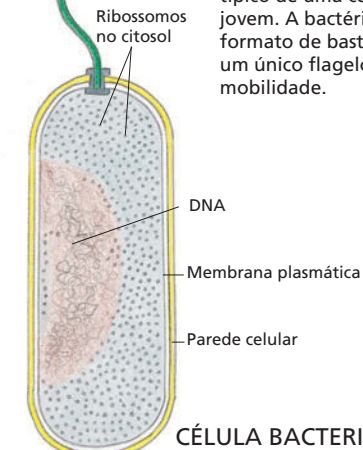
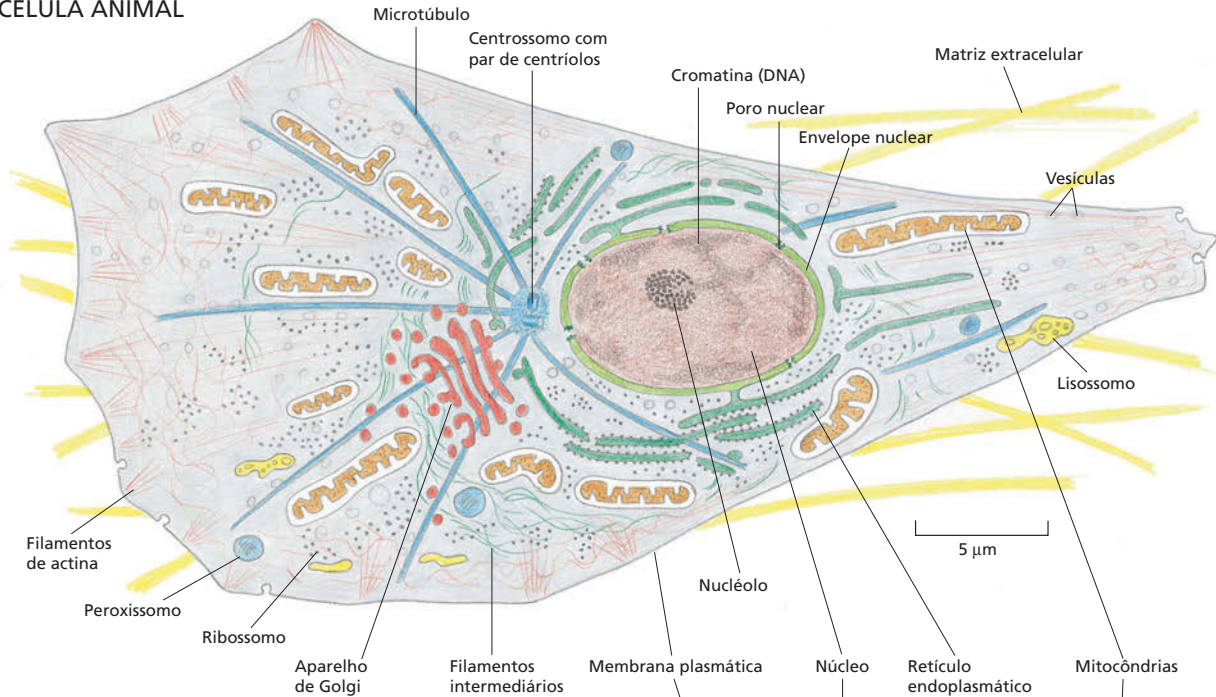



Figura 1-29 **De onde vêm os eucariotos?** As linhagens Eukarya, Bacteria e Archaea divergiram umas das outras muito cedo na evolução da vida na Terra. Acredita-se que, algum tempo depois, os eucariotos tenham adquirido mitocôndrias; mais tarde ainda, um subgrupo de eucariotos adquiriu cloroplastos. As mitocôndrias são essencialmente as mesmas nos vegetais, no animais e nos fungos, e por isso supõe-se que elas foram adquiridas antes que essas linhas divergissem.

PAINEL 1-2 Arquitetura celular

Três tipos de células estão desenhados aqui de maneira mais realista do que no desenho esquemático da Figura 1-24. De qualquer modo, as mesmas cores são utilizadas para distinguir os principais componentes da célula. O desenho da célula animal se baseia em um fibroblasto, uma célula que habita o tecido conectivo, depositando matriz extracelular. Uma micrografia de um fibroblasto vivo é mostrada na Figura 1-7A. O desenho da célula vegetal é típico de uma célula de folha jovem. A bactéria tem um formato de bastonete e possui um único flagelo para mobilidade.

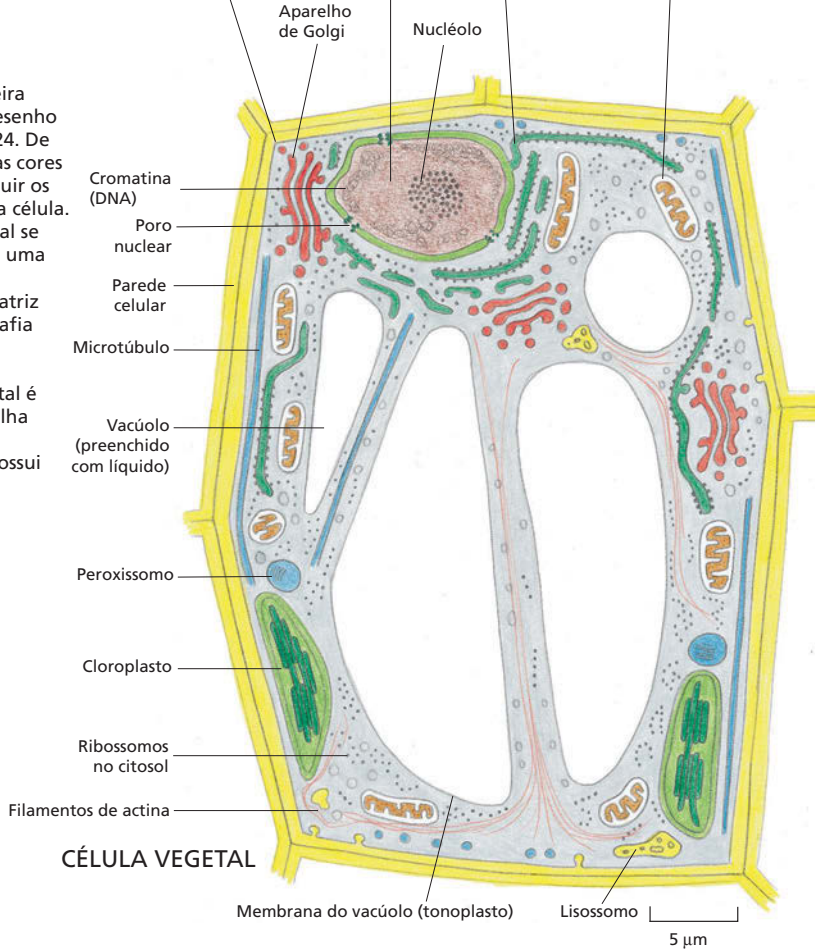
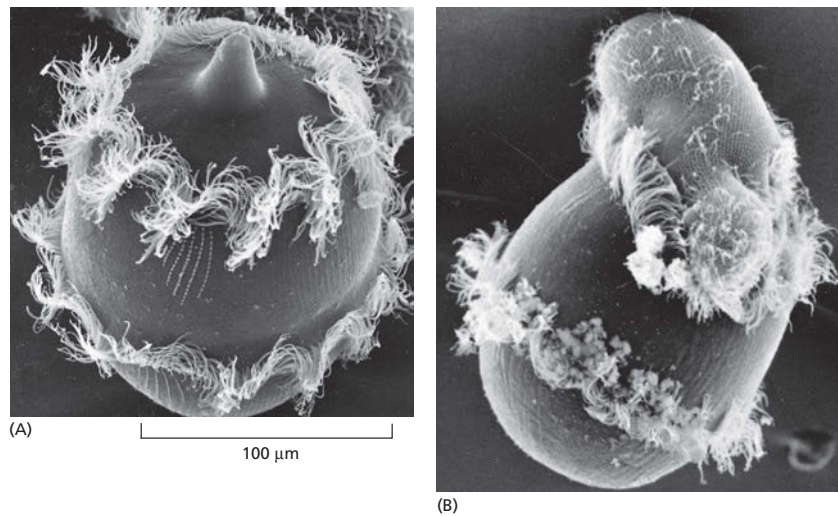



Figura 1-30 Um protozoário devorando outro. (A) A micrografia eletrônica de varredura mostra o *Didinium* tal como é, com seus anéis circunferenciais de cílios vibráteis e seu "focinho" no topo. (B) O *Didinium* é visualizado ingerindo outro protozoário ciliado, *Paramecium*. (Cortesia de D. Barlow.)

Esse eucarioto primitivo, com um núcleo e um citoesqueleto, era provavelmente o tipo de célula que englobava as bactérias de vida livre que consumiam oxigênio e que eram as ancestrais das mitocôndrias (ver Figura 1-19). Supõe-se que essa parceria tenha estabelecido-se há 1,5 bilhão de anos, quando a atmosfera da Terra se tornou rica em oxigênio pela primeira vez. Um subgrupo dessas células mais tarde adquiriu cloroplastos pelo englobamento de bactérias fotossintéticas (ver Figuras 1-21 e 1-29).

O comportamento de vários dos microrganismos ativamente móveis de vida livre, chamados de **protozoários**, sustenta que os eucariotos unicelulares podem atacar e devorar outras células. O *Didinium,* por exemplo, é um protozoário grande carnívoro, com um diâmetro de cerca de 150 μm – talvez 10 vezes a média de uma célula humana. Ele tem um corpo globular envolvido por duas franjas de cílios, e a sua parte anterior é achatada, exceto por uma única saliência um tanto similar a um focinho (**Figura 1-30**). O *Didinium* nada em altas velocidades por meio do batimento dos seus cílios. Quando ele encontra uma presa adequada, normalmente outro tipo de protozoário, libera inúmeros dardos paralisantes pequenos a partir da sua região do focinho. Então o *Didinium* se liga à outra célula e a devora, invaginando-se como uma bola oca para englobar a sua vítima, que é quase tão grande como ele próprio.

Os protozoários incluem algumas das células mais complexas conhecidas. A **Figura 1-31** transmite algo sobre a variedade de formas dos protozoários e o seu comportamento também variado: eles podem ser fotossintéticos ou carnívoros, móveis ou sedentários. A sua anatomia é muitas vezes elaborada e inclui estruturas como cerdas sensoriais, fotorreceptores, cílios vibráteis, apêndices semelhantes a hastes, partes bucais, ferrão e feixes contráteis semelhantes a músculos. Embora sejam unicelulares, os protozoários podem ser tão complexos e versáteis quanto vários organismos multicelulares.

ORGANISMOS-MODELO

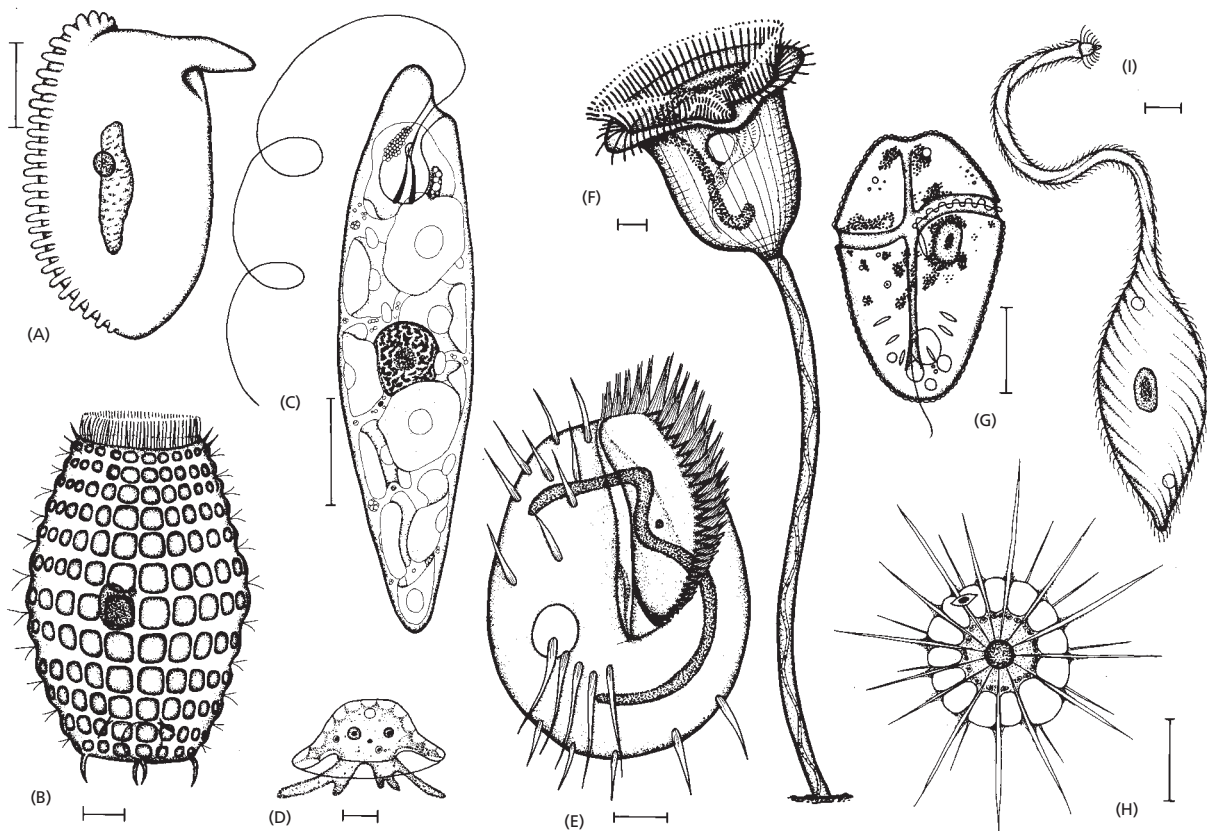
Acredita-se que todas as células sejam descendentes de ancestrais comuns cujas principais propriedades têm sido conservadas pela evolução. Assim, o conhecimento adquirido a partir do estudo de um organismo contribui para a nossa compreensão de outros, incluindo nós mesmos. Contudo, certos organismos são mais fáceis do que outros para serem estudados em laboratório. Alguns se reproduzem rapidamente e são convenientes para manipulações genéticas; outros são multicelulares, mas transparentes, de modo que se pode observar diretamente o desenvolvimento de todos os seus tecidos e órgãos internos. Por essas razões, grandes comunidades de biólogos se dedicaram a estudar os diferentes aspectos

da biologia de poucas espécies selecionadas, reunindo o seu conhecimento de forma a ganhar um conhecimento mais profundo do que aquele que poderia ser obtido se os seus esforços estivessem espalhados por várias espécies diferentes. A informação obtida a partir desses estudos contribui para o nosso entendimento de como as células trabalham. Embora a lista desses organismos representantes esteja expandindo continuamente, alguns se sobressaem em termos de amplitude e profundidade da informação que foi acumulada sobre eles durante os anos. Nas próximas seções, examinaremos alguns desses **organismos-modelo** e revisaremos os benefícios que cada um oferece para o estudo da biologia celular e, em vários casos, para a promoção da saúde humana.

Figura 1-31 **Uma variedade de protozoários ilustra a enorme diversidade dentro dessa classe de microrganismos unicelulares.** Esses desenhos foram realizados em diferentes escalas, mas em cada caso a barra de escala representa 10 μm. Os organismos em (A), (B), (E), (F) e (I) são ciliados; (C) é um euglenoide; (D) é uma ameba; (G) é um dinoflagelado, e (H) é um heliozoano. Para visualizar um euglenoide em ação, assista à **Animação 1.4**. (A partir de M. A. Sleigh, The Biology of Protozoa. London: Edward Arnold, 1973. Com permissão de Edward Arnold.)

Biólogos moleculares enfocaram a *E. coli*

No mundo das bactérias, as luzes da biologia molecular focaram, sobretudo, em apenas uma espécie: *Escherichia coli,* ou *E. coli* abreviadamente (ver Figura 1-11). Essa pequena célula bacteriana em forma de bastonete vive normalmente no intestino de humanos e outros vertebrados, mas ela pode crescer facilmente em um meio nutriente simples em um frasco de cultura. *E. coli* se dá bem com condições químicas variáveis no seu meio e se reproduz rapidamente. As suas instruções genéticas estão contidas em uma única molécula de DNA de fita dupla circular com aproximadamente 4,6 milhões de pares de nucleotídeos de comprimento, e ela sintetiza 4.300 tipos diferentes de proteínas.

Em termos moleculares, compreendemos o funcionamento de *E. coli* mais a fundo do que aquele de qualquer outro organismo vivo. A maior parte do nosso conhecimento acerca dos principais mecanismos de vida – incluindo como as células replicam o seu DNA e como elas decodificam essas instruções genéticas para sintetizar proteínas – foi obtida de estudos com *E. coli.* Pesquisas subsequentes confirmaram que esses processos básicos ocorrem essencialmente da mesma forma nas nossas próprias células como ocorrem em *E. coli.*

QUESTÃO 1-8

Seu vizinho de porta doou R$ 200,00 em apoio à pesquisa do câncer e está horrorizado em saber que o dinheiro está sendo gasto no estudo de levedura de cervejaria. Como você poderia tranquilizá-lo?

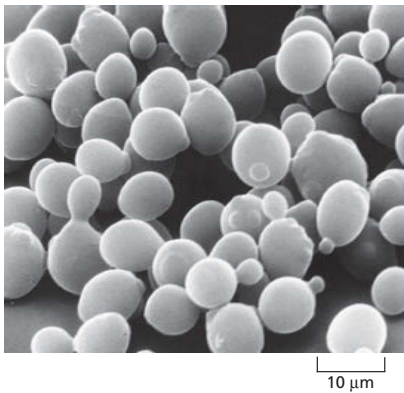



Figura 1-32 A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um eucarioto-modelo. Nessa micrografia eletrônica de varredura, algumas células de levedura são vistas no processo de divisão que elas fazem por brotamento. Outra micrografia da mesma espécie é mostrada na Figura 1-14. (Cortesia de Ira Herskowitz e Eric Schabatach.)

A levedura das cervejarias é uma célula eucariótica simples

Tendemos a nos preocupar com eucariotos porque nós mesmos somos eucariotos. Entretanto, as células humanas são complicadas e difíceis de trabalhar, e, se quisermos compreender os princípios da biologia das células eucarióticas, seja mais eficaz concentrar-se em uma espécie que, como *E. coli,* entre as bactérias, seja simples e robusta e se reproduza rapidamente. A escolha popular para esse papel de modelo eucariótico mínimo tem sido a levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae* (**Figura 1-32**) – o mesmo microrganismo que é utilizado para fermentar cerveja e assar pão.

S. cerevisiae é um fungo unicelular pequeno e, dessa forma, de acordo com a visão moderna, é no mínimo tão intimamente relacionada aos animais quanto é aos vegetais. Como outros fungos, ela tem uma parede celular rígida, é relativamente imóvel e possui mitocôndrias, mas não cloroplastos. Quando os nutrientes estão abundantes, ela se reproduz quase tão rapidamente como uma bactéria. Como o seu núcleo contém apenas cerca de 2,5 vezes mais DNA do que *E. coli,* essa levedura também é um bom modelo para análise genética. Mesmo que o seu genoma seja pequeno (para os padrões eucarióticos), *S. cerevisiae* realiza todas as tarefas básicas que cada célula eucariótica deve realizar. Estudos genéticos e bioquímicos em leveduras têm sido cruciais para entender vários mecanismos básicos nas células eucarióticas, incluindo o ciclo de divisão celular – a cadeia de eventos pela qual o núcleo e todos os outros componentes de uma célula são duplicados e divididos para criar duas células-filhas. De fato, a maquinaria que governa a divisão celular tem sido tão bem conservada durante o curso da evolução que vários dos seus componentes podem funcionar tanto em células de leveduras como de humanos. Se uma levedura mutante não tem um gene essencial para a divisão celular, o fornecimento de uma cópia do gene correspondente de humanos irá curar o defeito da levedura e permitir que ela se divida normalmente (ver **Como Sabemos**, p. 30-31).

Arabidopsis foi escolhida entre 300.000 espécies como uma planta-modelo

Os grandes organismos multicelulares que observamos ao nosso redor – tanto plantas como animais – parecem fantasticamente variados, mas eles são muito próximos uns dos outros nas suas origens evolucionárias e mais similares na sua biologia celular básica do que a grande variedade de organismos unicelulares microscópicos. Enquanto Bacteria, Archaea e Eukarya se separaram uns dos outros há mais de 3 bilhões de anos, as plantas, os animais e os fungos são separados apenas cerca de 1,5 bilhão de anos, peixes e mamíferos por aproximadamente 450 milhões de anos e as diferentes espécies de vegetais com flores por menos de 200 milhões de anos.

A relação evolucionária próxima entre todos os vegetais com flores significa que podemos ter uma ideia do interior de suas células e da biologia molecular, enfocando apenas algumas espécies convenientes para uma análise detalhada. Dentre as centenas de milhares de espécies de plantas com flores existentes na Terra hoje, os biólogos moleculares recentemente enfocaram os seus esforços sobre uma pequena erva daninha, o comum agrião-de-parede *Arabidopsis thaliana* (**Figura 1-33**), que pode ser cultivado em ambientes fechados em grande número e produzir milhares de descendentes por planta dentro de 8 a 10 semanas. *Arabidopsis* tem um genoma de aproximadamente 110 milhões de pares de nucleotídeos, cerca de 8 vezes mais do que as leveduras, e a sua sequência completa é conhecida. Examinando as instruções genéticas que a *Arabidopsis* carrega, estamos começando a aprender mais sobre a genética, a biologia molecular e a evolução das plantas com flores, que dominam quase todo o ecossistema sobre a Terra. Como os genes

Figura 1-33 *Arabidopsis thaliana*, o comum agrião-de-parede, é um vegetal-modelo. Essa pequena erva daninha se tornou o organismo favorito para os biólogos moleculares e do desenvolvimento de plantas. (Cortesia de Toni Hayden e John Innes Centre.)

encontrados na *Arabidopsis* possuem sósias nas espécies agrícolas, o estudo dessa erva daninha simples fornece uma percepção sobre o desenvolvimento e a fisiologia das plantas de produção das quais dependem as nossas vidas, assim como todas as outras espécies de plantas que são as nossas companheiras sobre a Terra.

O mundo dos animais está representado por uma mosca, um verme, um peixe, um camundongo e pelo *Homo sapiens*

Animais multicelulares representam a maioria das espécies catalogadas de organismos vivos, e a maioria de espécies animais são insetos. Por essa razão, um inseto, a pequena mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster* (**Figura 1-34**), deveria ocupar um lugar central na pesquisa biológica. De fato, os fundamentos da genética clássica foram construídos em grande parte com base nos estudos com esse inseto. Há mais de 80 anos, estudos com a mosca-das-frutas forneceram provas definitivas de que os genes – as unidades da hereditariedade – são carregados nos cromossomos. Em épocas mais recentes, um esforço sistemático concentrado foi feito para elucidar a genética da *Drosophila* e especialmente os mecanismos genéticos que governam o seu desenvolvimento embrionário e larval. Em virtude desse trabalho, estamos ao menos começando a entender com detalhes como as células vivas alcançam a sua proeza mais espetacular: como uma única célula-ovo fertilizada (ou *zigoto*) se desenvolve em um organismo multicelular que compreende um vasto número de células de diferentes tipos, organizadas de uma maneira exatamente previsível. Mutantes de *Drosophila* com partes do corpo no lugar errado ou com padrão estranho têm fornecido a chave para identificar e caracterizar os genes que são necessários para fazer um corpo adulto apropriadamente estruturado, com intestino, asas, pernas, olhos e todas as outras partes nos seus locais corretos. Esses genes – que são copiados e passados adiante para cada célula no corpo – definem como cada célula se comportará nas suas interações sociais com as suas irmãs e primas; dessa forma, eles controlam as estruturas que as células criam. A *Drosophila,* mais do que qualquer outro organismo, nos mostrou como traçar a cadeia de causa e efeito a partir das instruções genéticas codificadas no DNA para a estrutura do organismo multicelular adulto. Além disso, os genes de *Drosophila* revelaram ser similares àqueles de humanos – muito mais similares do que se esperaria a partir das aparências externas. Desse modo, a mosca serve como um modelo para estudar o desenvolvimento humano e as doenças. O genoma da mosca – 185 milhões de pares de nucleotídeos codificando mais de 13.000 genes – contém sósias para a maioria dos genes humanos incluindo a maioria daqueles sabidamente críticos nas doenças humanas.

Figura 1-34 ***Drosophila melanogaster*** **é uma das favoritas entre os biólogos do desenvolvimento e os geneticistas.** Estudos genéticos moleculares sobre essa pequena mosca têm fornecido a chave para entender como todos os animais se desenvolvem. (Cortesia de E. B. Lewis.)

COMO SABEMOS:
MECANISMOS COMUNS DA VIDA

Todos os seres vivos são feitos de células, e as células – como foi discutido neste capítulo – são todas fundamentalmente similares no seu interior: elas armazenam as suas instruções genéticas em moléculas de DNA, que direcionam a produção de proteínas, e as proteínas por sua vez realizam as reações químicas das células, dão a elas o seu formato e controlam o seu comportamento. No entanto, até que ponto essas similaridades realmente ocorrem? São as partes de uma célula permutáveis por partes de outra? Uma enzima que digere glicose em uma bactéria seria capaz de quebrar o mesmo açúcar se ela fosse solicitada para funcionar dentro de uma levedura, uma lagosta ou um humano? E quanto às maquinarias moleculares que copiam e interpretam a informação genética? Elas são funcionalmente equivalentes de um organismo para outro? Os seus componentes moleculares São permutáveis? As respostas têm vindo a partir de várias fontes, porém, mais notavelmente a partir de experimentos sobre um dos processos mais fundamentais da vida: a divisão celular.

Dividir ou morrer

Todas as células se originam a partir de outras células, e a única maneira de se fazer uma célula nova é pela divisão de uma célula preexistente. Para se reproduzir, uma célula parental deve realizar uma sequência ordenada de reações pelas quais ela duplica o seu conteúdo e se divide em duas. Esse processo crítico de duplicação e divisão, conhecido como *ciclo celular*, é complexo e cuidadosamente controlado. Defeitos em qualquer uma das proteínas envolvidas no ciclo celular podem ser fatais.

Infelizmente, os efeitos letais das mutações no ciclo celular apresentam um problema quando se quer achar os componentes da maquinaria que controlam o ciclo celular e descobrir como eles funcionam. Os cientistas dependem de mutantes para identificar genes e proteínas com base na sua função: se um gene é essencial para determinado processo, uma mutação que interrompe o gene aparecerá como um distúrbio naquele processo. Pela análise do comportamento anormal do organismo mutante, pode-se apontar a função para a qual o gene é necessário, e pela análise do DNA do mutante, pode-se rastrear o próprio gene.

Para uma análise assim, entretanto, uma única célula mutante não é suficiente: é necessária uma grande colônia de células que carrega a mutação. E esse é o problema. Se a mutação interrompe um processo crítico para a vida, como a divisão celular, como alguma vez alguém poderá obter uma colônia dessas? Os geneticistas encontraram uma solução engenhosa. Mutantes defectivos em genes do ciclo celular podem ser mantidos e estudados se o seu defeito for *condicional* – isto é, se o produto do gene falhar na sua função apenas sob certas condições específicas. Em particular, pode-se frequentemente encontrar mutações que são sensíveis à temperatura; a proteína mutante funciona corretamente quando o organismo mutante é mantido em temperatura baixa, permitindo que as células se reproduzam; mas quando a temperatura é aumentada, o calor desmancha a estrutura da proteína e destrói a sua atividade, permitindo que as células exibam o seu defeito de interesse (**Figura 1-35**). O estudo de tal mutante condicional em leveduras permitiu a descoberta de genes que controlam o ciclo de divisão celular – os genes *Cdc* – e levou à compreensão de como eles funcionam.

Revelou-se que os mesmos mutantes sensíveis à temperatura oferecem uma oportunidade para observar se as proteínas de um organismo podem funcionar permutavelmente em outro. Pode uma proteína de um organismo diferente curar um defeito no ciclo celular de uma levedura mutante e permitir que ela se reproduza normalmente? O primeiro experimento foi realizado utilizando duas espécies diferentes de leveduras.

Parente próximo

Leveduras – fungos unicelulares – são organismos populares para estudos da divisão celular. São eucariotos, como nós, e ainda são pequenos, simples, reproduzem-se rapidamente e são fáceis de manipular experimentalmente. *Saccharomyces cerevisiae*, a levedura mais amplamente estudada, divide-se pela formação de um pequeno broto que cresce constantemente até que se separe da célula-mãe (ver Figuras 1-14

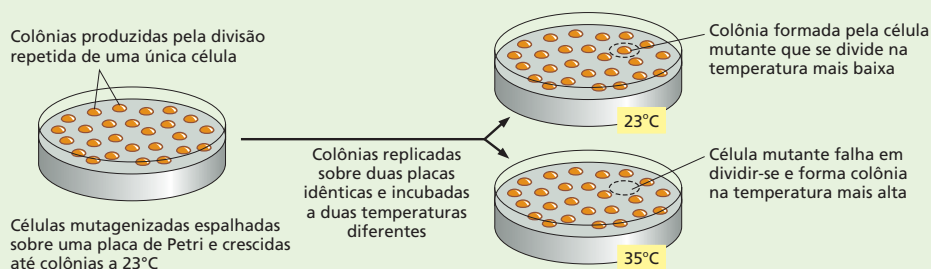
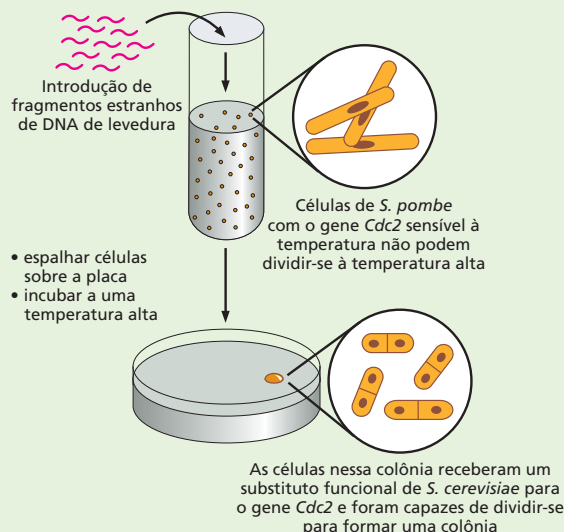



Figura 1-35 **Células de levedura que contêm uma mutação sensível à temperatura podem ser geradas no laboratório.** As células de levedura são incubadas com um composto que causa mutações no seu DNA. Elas são então espalhadas sobre uma placa, e permite-se que elas cresçam a uma temperatura baixa (23°C). Sob essas condições, as células contendo a mutação sensível à temperatura, ou nenhuma mutação, se dividem normalmente – cada uma produzindo uma colônia visível. As colônias são transferidas para duas placas de Petri idênticas usando uma técnica denominada semeadura em réplica. Uma dessas placas é incubada em temperatura baixa, e a outra, em uma temperatura mais alta (35°C) na qual a proteína mutante não pode funcionar, mas a proteína normal pode. As células que contêm uma mutação sensível à temperatura em um gene essencial para proliferação podem dividir-se na temperatura baixa, mas falham na temperatura mais alta.

Figura 1-36 Mutantes de *S. pombe* sensíveis à temperatura e defectivos em um gene do ciclo celular podem ser recuperados pelo gene equivalente de *S. cerevisiae*. O DNA de *S. cerevisiae* é coletado e quebrado em grandes fragmentos, que são introduzidos em uma cultura de mutantes de *S. pombe* sensíveis à temperatura. Discutiremos como o DNA pode ser manipulado e transferido para dentro de diferentes tipos de células no Capítulo 10. As células de levedura que recebem o DNA estranho são então espalhadas sobre uma placa contendo meio de cultura e incubadas na temperatura alta. As raras células que sobrevivem e proliferam sobre essas placas foram resgatadas pela incorporação de um gene estranho que permite a divisão normal mesmo na temperatura mais alta.

e 1-32). Uma segunda espécie de levedura, *Schizosaccharomyces pombe*, também é popular para estudos sobre o crescimento e a divisão celular. Nomeada após a cerveja africana da qual ela foi primeiro isolada, *S. pombe* é uma levedura em forma de bastonete que cresce por elongação das suas extremidades e se divide pela fissão em dois, por meio da formação de uma partição no centro do bastonete.

Embora elas se diferenciem pelo seu estilo de divisão celular, tanto as leveduras de brotamento como as de fissão devem copiar o seu DNA e distribuir esse material para a sua progênie. Para estabelecer se as proteínas que controlam todo o processo em *S. cerevisiae* e *S. pombe* são funcionalmente equivalentes, Paul Nurse e seus colegas começaram por determinar se mutantes do ciclo celular de *S. pombe* poderiam ser resgatados por um gene de *S. cerevisiae.* O ponto inicial foi uma colônia de mutantes sensíveis à temperatura de *S. pombe* que era incapaz de avançar pelo ciclo celular quando crescida a 35°C. Essas células mutantes tinham um defeito em um gene denominado *Cdc2,* que é necessário para acionar vários eventos-chave no ciclo de divisão celular. Pesquisadores, então, introduziram nessas células defectivas uma coleção de fragmentos de DNA preparados a partir de *S. cerevisiae* (**Figura 1-36**).

Quando essas culturas eram incubadas a 35°C, os pesquisadores observaram que algumas células recuperaram a capacidade de se reproduzir: quando espalhadas sobre uma placa com meio de cultura, essas células puderam dividir-se de novo, formando colônias visíveis contendo milhões de células de leveduras (ver Figura 1-35). Os pesquisadores descobriram que essas células "curadas" de leveduras receberam um fragmento de DNA contendo o gene equivalente de *S. cerevisae* – um gene que já era familiar a partir de estudos pioneiros acerca do ciclo de divisão celular (por Lee Hartwell e colegas) na levedura de brotamento.

Talvez o resultado não seja tão surpreendente. Quão diferente uma levedura pode ser da outra? E quanto a parentes mais distantes? Para descobrir, os pesquisadores realizaram o mesmo experimento, dessa vez utilizando DNA humano para resgatar os mutantes do ciclo celular de levedura. Os resultados foram os mesmos. Um gene humano equivalente resgatou os mutantes de levedura, permitindo que as células mutantes se dividissem normalmente.

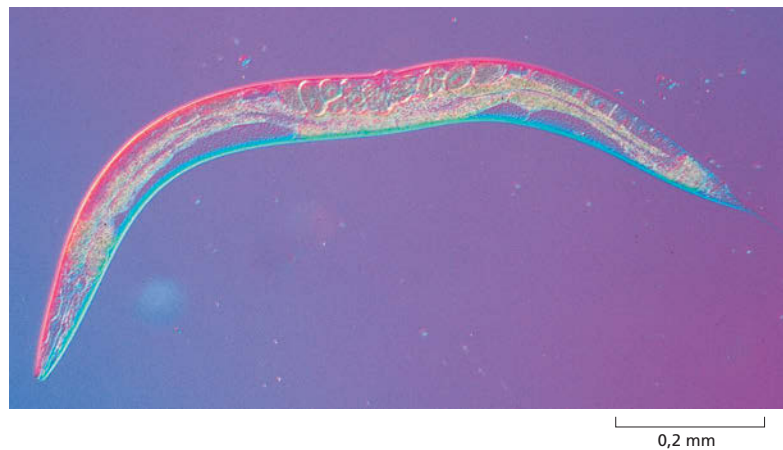
Lendo genes

As proteínas de humanos e de leveduras não são apenas funcionalmente equivalentes, elas têm quase o mesmo tamanho e consistem em aminoácidos unidos em uma ordem muito semelhante. Quando a equipe de Nurse analisou a sequência de aminoácidos das proteínas, observou que a proteína humana Cdc2 é idêntica à proteína Cdc2 de *S. pombe* em 63% dos seus aminoácidos e 58% idêntica à proteína equivalente de *S. cerevisiae* (**Figura 1-37**).

Esses experimentos mostraram que as proteínas de diferentes organismos podem ser funcionalmente permutáveis. Na realidade, as moléculas que orquestram a divisão celular em eucariotos são tão fundamentalmente importantes que elas têm sido conservadas quase sem alterações por mais de um bilhão de anos de evolução dos eucariotos.

O mesmo experimento realça outro ponto até mais básico. As células mutantes de levedura foram resgatadas não pela injeção direta da proteína humana, mas pela introdução de um pedaço de DNA humano. As células de levedura foram capazes de ler e usar essa informação corretamente, pois a maquinaria molecular para ler a informação codificada no DNA também é similar de célula para célula e de organismo para organismo. Uma célula de levedura possui todo equipamento necessário para interpretar as instruções codificadas em um gene humano e para usar essa informação para direcionar a produção de uma proteína humana totalmente funcional.

Figura 1-37 As proteínas do ciclo de divisão celular de leveduras e de humanos são muito similares nas suas sequências de aminoácidos. As identidades entre as sequências de aminoácidos de uma região da proteína Cdc2 humana e uma região similar da proteína equivalente em *S. pombe* e *S. cerevisiae* estão marcadas por uma sombra *verde*. Cada aminoácido está representado por uma única letra.

Figura 1-38 ***Caenorhabditis elegans*** **foi o primeiro organismo multicelular cujo genoma completo foi sequenciado.** Este pequeno verme nematódeo vive no solo. O seu desenvolvimento, a partir do óvulo fertilizado até 959 células do corpo adulto, tem sido traçado com detalhes extraordinários, e um grande conhecimento foi gerado acerca dos mecanismos genéticos subjacentes. A maioria dos indivíduos é hermafrodita, produzindo tanto óvulos como espermatozoides. A coloração nessa fotografia é devida a uma forma especial de iluminação utilizada para aumentar o contraste da imagem; o verme é transparente e sem cor. (Cortesia de Ian Hope.)

Outro organismo amplamente estudado, menor e mais simples do que a *Drosophila* é o verme nematódeo *Caenorhabditis elegans* (**Figura 1-38**), um parente inofensivo dos nematódeos que atacam as raízes de plantações. Essa criatura se desenvolve com a precisão de um relógio a partir de uma célula-ovo fertilizada até um adulto com exatamente 959 células do corpo (mais um número variável de óvulos e espermatozoides) –, um grau anormal de regularidade para um animal. Agora temos uma descrição minuciosamente detalhada da sequência de eventos pela qual esse processo passa – à medida que a célula se divide, move e se torna especializada, de acordo com regras precisas e previsíveis. O seu genoma – alguns 97 milhões de pares de nucleotídeos contendo cerca de 19.000 genes – foi sequenciado, e uma abundância de mutantes está disponível para testar como esses genes funcionam. Parece que 70% das proteínas humanas têm algum sósia no verme, e o *C. elegans,* assim como a *Drosophila,* tem provado ser um modelo valioso para vários dos processos que ocorrem nos nossos próprios corpos. Estudos no desenvolvimento dos nematódeos, por exemplo, conduziram a uma compreensão molecular detalhada da *morte celular programada*, um processo pelo qual as células excedentes são descartadas em todos os animais – um tópico de grande importância para a pesquisa do câncer (discutido nos Capítulos 18 e 20).

Outro organismo que forneceu uma percepção dos processos de desenvolvimento, particularmente em vertebrados, é o *peixe-zebra* (**Figura 1-39**). Como essa criatura é transparente nas duas primeiras semanas de vida, ela fornece um sistema ideal para observar como as células se comportam durante o desenvolvimento em um animal vivo.

Figura 1-39 **Os peixes-zebra são modelos populares para estudar o desenvolvimento de vertebrados.** Esses pequenos peixes tropicais são convenientes para a genética e possuem embriões transparentes, de modo que se podem observar as células em movimento e alterações nas suas características no organismo vivo à medida que se desenvolve. (Com permissão de Steve Baskauf.)

No outro extremo, os mamíferos estão entre os animais mais complexos, com 2 vezes mais genes do que a *Drosophila,* 25 vezes mais DNA por célula e milhões de vezes mais células no seu corpo adulto. O camundongo, há muito tempo, vem sendo utilizado como organismo-modelo para o estudo da genética, do desenvolvimento, da imunologia e da biologia celular de mamíferos. Novas técnicas têm dado a ele uma importância ainda maior. Atualmente, é possível cruzar camundongos com mutações deliberadamente geradas em qualquer gene específico, ou com genes construídos artificialmente e neles introduzidos. Dessa forma, pode-se testar para que um gene é necessário e como ele funciona. Quase todo gene humano tem um sósia no camundongo, com sequência de DNA e função similares.

Humanos não são camundongos – ou peixes ou vermes ou moscas ou leveduras –, e por isso também estudamos o próprio ser humano. A pesquisa em várias áreas da biologia celular tem sido bastante direcionada pelo interesse médico, e muito do que sabemos foi obtido pelos estudos de células humanas. Os dados médicos sobre células humanas são enormes, e, embora mutações que ocorrem naturalmente em qualquer gene sejam raras, as consequências de mutações em milhares de genes diferentes são conhecidas sem fazer uso da engenharia genética. Isso porque os humanos demonstram o comportamento único de relatar

Figura 1-40 Espécies vivas diferentes compartilham genes similares. O bebê humano e o camundongo mostrados aqui têm manchas brancas similares nas suas testas porque ambos têm defeitos no mesmo gene (denominado *Kit*), necessário para o desenvolvimento e a manutenção das células de pigmento. (Cortesia de R. A. Fleischman, a partir de *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:10885-10889, 1991. Com permissão da National Academy of Sciences.)

e registrar seus próprios defeitos genéticos; em nenhuma outra espécie existem bilhões de indivíduos tão intensamente examinados, descritos e investigados.

Contudo, a extensão de nossa ignorância ainda é assustadora. O corpo de mamíferos é muito complexo e pode parecer desanimador entender como o DNA em um óvulo fertilizado de camundongo gera um camundongo, ou como o DNA em um óvulo humano fertilizado governa o desenvolvimento de um humano. Até agora, as revelações da biologia molecular têm feito a tarefa parecer possível. De tal modo, esse novo otimismo vem da constatação de que os genes de um tipo de animal têm uma contraparte próxima na maioria dos outros tipos de animais, aparentemente cumprindo funções similares (Figura 1-40). Todos temos uma origem evolucionária comum, e, superficialmente, parece que compartilhamos os mesmos mecanismos moleculares. Moscas, peixes, vermes, camundongos e humanos fornecem, dessa forma, a chave para entender como os animais em geral são feitos e como as suas células funcionam.

A comparação de sequências do genoma revelou a herança comum da vida

Em nível molecular, as alterações evolucionárias têm sido notavelmente lentas. Podemos observar, nos organismos dos dias de hoje, várias características que foram preservadas por mais de 3 bilhões de anos de vida sobre a Terra, ou cerca de um quinto da idade do universo. Essa conservação evolucionária fornece o fundamento sobre o qual o estudo da biologia molecular é construído. Para estabelecer o cenário para os capítulos que se seguem, entretanto, terminamos esse capítulo considerando, com um pouco mais de intimidade, os relacionamentos familiares e as similaridades básicas entre todos os seres vivos. Esse tópico foi bastante esclarecido nos últimos anos pela análise das sequências do genoma – as sequências nas quais os quatro nucleotídeos universais estão alinhados para formar o DNA de uma dada espécie (como discutido com maiores detalhes no Capítulo 9).

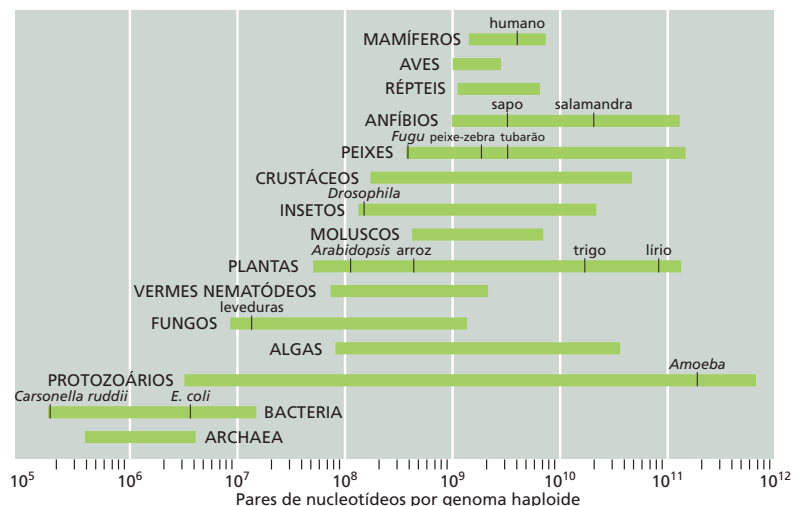
O sequenciamento de DNA tornou fácil a detecção de semelhanças de família entre os genes: se dois genes de organismos diferentes têm sequências de DNA bastante semelhantes, é muito provável que ambos os genes sejam descendentes de um gene ancestral comum. Os genes (e produtos de genes) relacionados dessa forma são chamados de **homólogos**. Dadas as sequências genômicas completas de organismos representantes de todos os três domínios de vida – Archaea, Bacteria e Eukarya –, pode-se procurar sistematicamente por homologias que se estendam por meio dessa enorme divisão evolucionária. Dessa maneira, podemos começar a avaliar a herança comum de todos os seres vivos e traçar de volta as origens da vida até as primeiras células ancestrais. Existem dificuldades nesse empreendimento: alguns genes ancestrais foram perdidos, e alguns se alteraram tanto que eles não são mais prontamente reconhecidos como parentes. Apesar dessas incertezas, a comparação de sequências do genoma dos ramos mais amplamente separados da árvore da vida pode nos dar um discernimento de quais genes são necessidades fundamentais para as células vivas.

Uma comparação dos genomas completos de cinco Bacteria, uma Archaea e um Eukarya (uma levedura) revela um grupo central de 239 famílias de genes que codificam para proteínas que têm representantes em todos os três domínios. Para a maioria desses genes, pode ser designada uma função, com o maior número de famílias de genes compartilhados envolvido no metabolismo e no transporte de aminoácidos e na produção e função dos ribossomos. Dessa forma, o número mínimo de genes necessários para uma célula ser viável nos meios de hoje é provavelmente não menos do que 200-300 genes. O genoma mais abundante anotado até o momento é o de uma bactéria denominada *Carsonella ruddii*, que vive dentro de células especializadas do piolho de plantas e possui 182 genes. Entretanto, esse organismo depende de genes do seu inseto hospedeiro para realizar suas funções essenciais.

A maioria dos organismos possui significativamente mais do que o mínimo estimado de um par de centenas de genes. Até mesmo procariotos – células parcimoniosas que carregam pouquíssima bagagem genética supérflua – tipicamente têm genomas que contêm no mínimo 1 milhão de pares de nucleotídeos e codificam de 1.000 a 8.000 genes. Com esses poucos milhares de genes, as bactérias são capazes de se desenvolver até mesmo no mais hostil meio sobre a Terra.

Os genomas compactos de bactérias típicas são diminutos se comparados aos genomas de eucariotos típicos. O genoma humano, por exemplo, contém cerca de 700 vezes mais DNA do que o genoma de *E. coli,* e o genoma de uma samambaia contém cerca de 100 vezes mais do que o de um humano (**Figura 1-41**). Em termos de número de genes, entretanto, as diferenças não são tão grandes. Temos apenas cerca de sete vezes o número de genes de *E. coli,* se considerarmos um gene como uma extensão de DNA que contém as especificações para uma molécula proteica. Além disso, vários dos nossos 24.000 genes que codificam para proteínas e as próprias proteínas correspondentes caem em grupos familiares relacionados, como a família das hemoglobinas, que tem nove membros intimamente relacionados nos humanos. O número de proteínas fundamentalmente diferente em um humano é, dessa maneira, não muitas vezes maior do que em uma bactéria, e o número de genes humanos que tem contrapartes identificáveis nas bactérias é uma fração significativa do total.

O restante do nosso DNA humano – o vasto volume que não codifica para proteína ou para moléculas de RNA funcionais – é uma mistura de sequências que ajudam a regular a expressão dos genes e de sequências que parecem ser lixo dispensável, guardado como uma massa de papéis velhos, porque, se não existe pressão para manter um arquivo pequeno, é mais fácil salvar tudo do que selecionar as informações valiosas e descartar o resto. A grande quantidade de DNA regulador permite a enorme complexidade e sofisticação na maneira em que dife-

Figura 1-41 **Os organismos variam muito no tamanho dos seus genomas.** O tamanho do genoma é medido em pares de bases de DNA por genoma haploide, isto é, por uma única cópia do genoma. (As células de organismos que se reproduzem sexualmente como nós mesmos são geralmente diploides: elas contêm duas cópias do genoma, uma herdada a partir da mãe, a outra, a partir do pai.) Organismos intimamente relacionados podem variar de forma ampla na quantidade de DNA em seus genomas (como indicado pelo comprimento das barras em *verde*), mesmo que eles contenham um número similar de genes funcionalmente distintos. (Adaptada a partir de T. R. Gregory, 2008, Animal Genome Size Database: www.genomesize.com.)

rentes genes em um organismo eucarioto multicelular são induzidos a agir em diferentes momentos e locais. A lista básica de partes – o conjunto de proteínas que as nossas células podem sintetizar, como especificado pelo DNA – não é muito mais longa do que a lista das partes de um automóvel, e várias dessas partes são comuns não apenas para todos os animais, mas também para todo o mundo vivo.

Que uma extensão de DNA pode programar o crescimento, o desenvolvimento e a reprodução de células vivas e organismos complexos é certamente um fenômeno maravilhoso. No restante deste livro, tentaremos explicar como as células funcionam – examinando suas partes componentes e observando como essas partes trabalham juntas e pela investigação de como o genoma de cada célula direciona a manufatura desses componentes de modo a reproduzir e administrar cada ser vivo.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- **As células são as unidades fundamentais da vida. Acredita-se que todas as células dos dias atuais se desenvolveram a partir de uma célula ancestral que existiu há mais de 3 bilhões de anos.**
- **Todas as células, e, portanto, todos os seres vivos, crescem, convertem energia a partir de uma forma para outra, percebem e respondem ao seu meio e se reproduzem.**
- **Todas as células são envolvidas por uma membrana plasmática que separa o interior da célula do meio.**
- **Todas as células contêm DNA como um depósito de informação genética e o utilizam para guiar a síntese de moléculas de RNA e de proteínas.**
- **Mesmo que todas as células em um organismo multicelular contenham o mesmo DNA, elas podem ser muito diferentes. Elas ativam diferentes grupos de genes de acordo com sua história do desenvolvimento e com as pistas que recebem do meio.**
- **As células de tecidos animais e vegetais têm tipicamente 5-20 μm de diâmetro e podem ser visualizadas com um microscópio óptico, que também revela alguns dos seus componentes internos ou organelas.**
- **O microscópio eletrônico permite que organelas menores e até mesmo moléculas grandes individuais sejam visualizadas, mas os espécimes requerem preparações elaboradas e não podem ser visualizados vivos.**
- **As células vivas atuais mais simples são procariotos: embora elas contenham DNA, não têm um núcleo nem outras organelas e provavelmente se parecem mais com a célula ancestral.**
- **Diferentes espécies de procariotos são diversas nas suas capacidades químicas e habitam uma ampla variedade de hábitats. Duas subdivisões evolucionárias fundamentais são reconhecidas: Bacteria e Archaea.**
- **As células eucarióticas possuem um núcleo e outras organelas não encontradas nos procariotos. Elas provavelmente evoluíram em uma série de estágios. Uma etapa importante parece ter sido a aquisição de mitocôndrias, que se acredita terem se originado de bactérias englobadas por uma célula eucariótica ancestral.**
- **O núcleo é a organela mais proeminente na maioria das células vegetais e animais. Ele contém a informação genética do organismo armazenada em moléculas de DNA. O resto do conteúdo celular, fora o núcleo, constitui o citoplasma.**
- **O citoplasma inclui todo o conteúdo celular fora do núcleo. Ele contém uma variedade de organelas envoltas por membranas com funções químicas especializadas. As mitocôndrias realizam a oxidação de moléculas de alimento. Nas células vegetais, os cloroplastos realizam a fotossíntese. O retículo endoplasmático (RE), o complexo de Golgi e os lisossomos permitem que as células sintetizem moléculas complexas para exporta-**

ção a partir da célula e para inserção nas membranas celulares, assim como para importação e digestão de grandes moléculas.

- Fora das organelas envoltas por membranas no citoplasma está o citosol, uma mistura concentrada de moléculas grandes e pequenas que realizam vários processos bioquímicos essenciais.
- O citoesqueleto se estende pelo citoplasma. Esse sistema de filamentos proteicos é responsável pelo formato e pelo movimento das células e pelo transporte de organelas e moléculas a partir de um local para outro no citoplasma.
- Microrganismos eucarióticos unicelulares de vida livre incluem algumas das células eucarióticas mais complexas conhecidas, e elas são capazes de nadar, cruzar, caçar e devorar alimento.
- Um animal, planta ou fungo consiste em diversos tipos de células eucarióticas, todas derivadas a partir de um único óvulo fertilizado; o número de tais células que cooperam para formar um grande organismo multicelular como o humano fica em torno de milhares de bilhões.
- Os biólogos escolheram um pequeno número de organismos-modelo para serem estudados mais de perto. Esses incluem a bactéria *E. coli*, a levedura de cervejaria, um verme nematódeo, uma mosca, uma pequena planta, um peixe, um camundongo e a própria espécie humana.
- Embora o número mínimo de genes necessários para uma célula viável seja menor do que 400, a maioria das células contém significativamente mais. Contudo, mesmo um organismo tão complexo quanto o humano possui apenas cerca de 24.000 genes codificantes de proteínas – o dobro da mosca e sete vezes mais do que a *E. coli*

TERMOS-CHAVE

Archaea	eucarioto	nanômetro
Bacteria	evolução	núcleo
célula	genoma	organela
cloroplasto	homólogo	procarioto
cromossomo	micrômetro	proteína
citoplasma	microscópio	protozoário
citoesqueleto	mitocôndria	ribossomo
citosol	organismo-modelo	RNA
DNA		

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 1-9

Agora você deve estar familiarizado com os seguintes componentes celulares. Defina brevemente o que eles são e quais as funções que eles fornecem para as células.

A. citosol
B. citoplasma
C. mitocôndria
D. núcleo
E. cloroplastos
F. lisossomos
G. cromossomos
H. aparelho de Golgi
I. peroxissomos
J. membrana plasmática
K. retículo endoplasmático
L. citoesqueleto

QUESTÃO 1-10

Quais das seguintes afirmativas estão corretas? Explique as suas respostas.

A. A informação hereditária de uma célula é passada adiante pelas suas proteínas.
B. O DNA bacteriano é encontrado no citosol.
C. Os vegetais são compostos de células procarióticas.
D. Todas as células de um mesmo organismo têm o mesmo número de cromossomos (com exceção dos óvulos e dos espermatozoides).
E. O citosol contém organelas envolvidas por membranas, como os lisossomos.

F. O núcleo e as mitocôndrias estão envolvidos por uma dupla membrana.

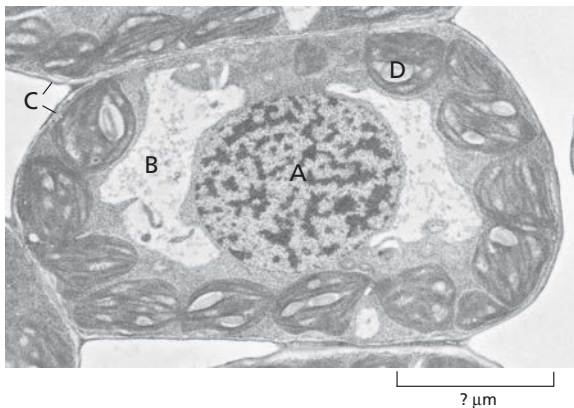
G. Os protozoários são organismos complexos com um grupo de células especializadas que formam tecidos, como os flagelos, partes bucais, ferrões e apêndices semelhantes a pernas.

H. Os lisossomos e os peroxissomos são o local de degradação de materiais indesejados.

QUESTÃO 1-11

Para se ter uma percepção do tamanho das células (e usar o sistema métrico), considere o seguinte: o cérebro humano pesa cerca de 1 kg e contém cerca de 10^{12} células. Calcule o tamanho médio de uma célula do cérebro (embora saibamos que os seus tamanhos variam amplamente), assumindo que cada célula está inteiramente preenchida com água (1 cm^3 de água pesa 1g). Qual seria o comprimento de um lado dessa célula de tamanho médio do cérebro se ela fosse um simples cubo? Se as células fossem espalhadas em uma fina camada que tem apenas uma célula de espessura, quantas páginas deste livro esta camada cobriria.

QUESTÃO 1-12

Identifique as diferentes organelas indicadas com letras na micrografia eletrônica mostrada na figura a seguir. Estime o comprimento da barra de escala na figura.

QUESTÃO 1-13

Existem três classes principais de filamentos que compõem o citoesqueleto. Quais são elas e quais são as diferenças nas suas funções? Quais filamentos do citoesqueleto seriam mais abundantes em uma célula muscular ou em uma célula da epiderme que compõe a camada externa da pele? Explique as suas respostas.

QUESTÃO 1-14

A seleção natural é uma força muito poderosa na evolução, pois até mesmo as células com uma pequena vantagem no crescimento rapidamente superam as suas competidoras. Para ilustrar esse processo, considere uma cultura de células que contém 1 milhão de células bacterianas que duplicam a cada 20 minutos. Uma única célula nessa cultura adquire uma mutação que permite a ela dividir-se mais rapidamente, com um tempo de geração de apenas 15 minutos. Assumindo que existe um suprimento ilimitado de nutrientes e nenhuma morte celular, quanto tempo levaria antes que a progênie da célula mutada se tornasse predominante na cultura? (Antes de começar a calcular, faça uma suposição: você acha que isso levaria cerca de um dia, uma semana, um mês ou um ano?) Quantas células de cada tipo estariam presentes na cultura nesse momento? (O número de células N na cultura no tempo t é descrito pela equação $N = N_0 \times 2^{t/G}$, onde N_0 é o número de células no tempo zero, e G é o tempo de geração.)

QUESTÃO 1-15

Quando bactérias são cultivadas sob condições adversas, isto é, na presença de um veneno como um antibiótico, a maioria das células cresce e se prolifera lentamente. Contudo, não é incomum que a velocidade de crescimento de uma cultura bacteriana mantida na presença do veneno seja restabelecida, após alguns dias, para aquela observada na sua ausência. Sugira por que esse pode ser o caso.

QUESTÃO 1-16

Aplique o princípio do crescimento exponencial, como descrito na Questão 1-14, às células em um organismo multicelular como o seu. Existem cerca de 10^{13} células no seu corpo. Assuma que uma célula adquira uma mutação que permite que ela se divida de maneira descontrolada (isto é, ela se torna uma célula cancerosa). Algumas células cancerosas podem proliferar-se com um tempo de geração de cerca de 24 horas. Se nenhuma das células cancerosas morreu, quanto tempo levaria antes que as 10^{13} células no seu corpo fossem células cancerosas? (Use a equação $N = N_0 \times 2^{t/G}$, com t, o tempo, e G, o tempo de cada geração. Sugestão: $10^{13} \cong 2^{43}$.)

QUESTÃO 1-17

Discuta a seguinte afirmação: "A estrutura e a função de uma célula viva são ditadas por leis da física e da química".

QUESTÃO 1-18

Quais são, se houver alguma, as vantagens de ser multicelular?

QUESTÃO 1-19

Desenhe na escala um esquema de duas células esféricas, o primeiro, uma bactéria com 1 μm de diâmetro, o outro, uma célula animal com um diâmetro de 15 μm. Calcule o volume, a área de superfície e a proporção entre superfície e volume para cada célula. Como esse valor alteraria se você incluísse as membranas internas da célula no cálculo da área de superfície (considere que as membranas internas tenham 15 vezes a área da membrana plasmática)? (O volume de uma esfera é dado por $4\pi R^3/3$, e a sua superfície, por $4\pi R^2$, onde R é o raio.) Discuta a seguinte hipótese: "As membranas internas permitiriam que células maiores se desenvolvessem".

QUESTÃO 1-20

Quais são os argumentos para "todas as células vivas se desenvolveram a partir de uma célula ancestral comum"? Considere os primórdios da evolução da vida sobre a Terra. Você assumiria que a célula ancestral primordial foi a primeira e a única célula a se formar?

QUESTÃO 1-21

Na Figura 1-26, as proteínas estão em azul, os ácidos nucleicos estão em laranja ou vermelho, os lipídeos estão em amarelo, e os polissacarídeos estão em verde. Identifique as principais organelas e outras estruturas celulares importantes mostradas nessa fatia de uma célula eucariótica.

QUESTÃO 1-22

Observando água de uma poça sob o microscópio, você percebe uma célula não familiar em forma de bastonete com cerca de 200 μm de comprimento. Sabendo que algumas Bacterias excepcionais podem ser tão grandes ou até mesmo maiores, você gostaria de saber se a sua célula é uma bactéria ou um eucarioto. Como você vai decidir? Se não for um eucarioto, como você descobrirá se é uma Bacteria ou uma Archaea?

CAPÍTULO 2

Componentes Químicos das Células

LIGAÇÕES QUÍMICAS

AS MOLÉCULAS NAS CÉLULAS

AS MACROMOLÉCULAS NAS CÉLULAS

Inicialmente, é difícil aceitar a ideia de que os organismos vivos sejam meramente um sistema químico. A inacreditável diversidade das formas vivas, com comportamentos aparentemente de autodeterminação e habilidade para crescer e se reproduzir parece colocá-los à parte do mundo dos sólidos, líquidos e gases descritos geralmente pela química. Até o século XIX, foi aceito amplamente que os animais tinham uma força vital – um "*animus*" – que era responsável pelas suas propriedades características.

Hoje sabe-se que não há nada nos organismos vivos que desobedeça às leis da química e da física. Entretanto, a química da vida, sem dúvida, é de um tipo muito especial. Primeiro, ela se baseia fundamentalmente em compostos de carbono, cujo estudo é conhecido como *química orgânica.* Em segundo lugar, ela depende quase que exclusivamente de reações que ocorrem em soluções *aquosas* e na faixa de temperatura relativamente estreita que existe na Terra. Em terceiro, a química das células é extremamente complexa, mesmo a mais simples das células tem uma química muitíssimas vezes mais complicada do que qualquer outro sistema químico conhecido. Quarto, ela é dominada e coordenada por cadeias enormes de *moléculas poliméricas* – cadeias de **subunidades** ligadas pelas extremidades – cujas propriedades únicas permitem que as células e os organismos cresçam e se reproduzam e ainda façam todas as outras coisas que são peculiares à vida. Por fim, ela é finamente regulada: as células se organizam com um grande número de mecanismos para assegurar que todas as suas reações químicas ocorram corretamente no espaço e no tempo.

A química, de certo modo, determina tudo na biologia. Neste capítulo, será feito um breve resumo da química da célula viva. Serão vistas as moléculas que formam as células e também serão examinadas as suas estruturas, as suas formas e as suas propriedades químicas. Essas moléculas determinam o tamanho, a estrutura e as funções das células. Pela compreensão de como as moléculas interagem, veremos como as células exploram as leis da química e da física para permanecerem vivas.

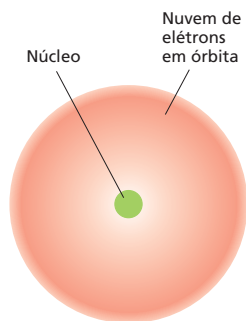



Figura 2-1 O átomo é formado por um núcleo rodeado por uma nuvem eletrônica. O núcleo, denso e carregado positivamente, contém a maior parte da massa do átomo. Os elétrons, muito mais leves e carregados negativamente, ocupam o espaço ao redor do núcleo, governados pelas leis da mecânica quântica. Os elétrons estão desenhados como uma nuvem contínua porque não há maneira de predizer com exatidão onde o elétron se encontra em cada instante de tempo. A densidade do sombreamento da nuvem indica a probabilidade de que o elétron seja encontrado lá. O diâmetro da nuvem eletrônica varia entre 0,1 nm (para o hidrogênio) e 0,4 nm (para átomos de número atômico elevado). O núcleo é muito menor, cerca de 2×10^{-5} nm para o carbono, por exemplo.

LIGAÇÕES QUÍMICAS

A matéria é feita de combinações de *elementos* – substâncias como o hidrogênio ou o carbono que não podem ser decompostas ou convertidas em outros elementos por meios químicos. A menor partícula de um elemento que ainda retém as propriedades características do elemento é o *átomo.* Entretanto, as características de substâncias outras que não elementos puros – incluindo os materiais que formam as células vivas – dependem de quais átomos formam essas substâncias e da maneira pela qual estão ligados entre si, em agrupamentos que formam as *moléculas.* Para entender como os organismos vivos são constituídos a partir da matéria inanimada, porém, é fundamental saber como são formadas as ligações químicas que mantêm os átomos das moléculas unidos entre si.

As células são formadas por poucos tipos de átomos

Cada **átomo** tem um núcleo central denso e com carga positiva no seu centro que, a uma certa distância, é rodeado por uma nuvem de **elétrons** carregados negativamente, os quais são mantidos em órbitas ao redor do núcleo por atração eletrostática (**Figura 2.1**). Por sua vez, o núcleo dos átomos é constituído por dois tipos de partículas subatômicas: **prótons**, que são carregados positivamente, e *nêutrons*, que são eletricamente neutros. O número de prótons em um núcleo atômico determina o *número atômico*. Um átomo de hidrogênio tem um núcleo composto de um único próton. O hidrogênio, portanto, com o número atômico 1, é o mais leve dos elementos. Um átomo de carbono tem seis prótons no seu núcleo e um número atômico 6 (**Figura 2-2**). A carga elétrica carregada por um próton é exatamente igual e oposta à carga de um elétron. Como o átomo, na sua totalidade, é eletricamente neutro, o número de elétrons negativamente carregados que rodeiam o núcleo é igual ao número de prótons carregados positivamente que estão contidos no núcleo, de modo que o número de elétrons de um átomo é exatamente igual ao seu número atômico. Todos os átomos de um elemento têm o mesmo número atômico, e logo veremos que esse número determina o comportamento químico do elemento.

Nêutrons são partículas subatômicas não carregadas que, essencialmente, têm a mesma massa dos prótons. Eles contribuem para a estabilidade estrutural do núcleo – se forem em número muito pequeno ou elevado, o núcleo pode desintegrar-se por decaimento radioativo –, mas não alteram as propriedades químicas do átomo. Assim, um elemento pode existir sob distintas formas físicas, mas que são quimicamente idênticas. Essas formas são denominadas *isótopos,* e cada isótopo de um elemento tem um número de nêutrons diferente, porém um mesmo número de prótons. Vários isótopos de praticamente todos os elementos ocorrem naturalmente, mas alguns são instáveis. Por exemplo, enquanto a maior parte do carbono presente na Terra existe como o isótopo es-

Figura 2-2 O número de prótons de um átomo determina seu número atômico. Representação esquemática de um átomo de carbono e de um átomo de hidrogênio. O núcleo de cada átomo, exceto do hidrogênio, constitui-se tanto de prótons carregados positivamente como de nêutrons eletricamente neutros. O número de elétrons de um átomo é igual ao número de prótons, de modo que o átomo não tem carga líquida. Diferentemente da Figura 2-1, os elétrons são mostrados como partículas individuais. Os círculos *pretos* concêntricos representam de forma altamente esquemática as "órbitas" (isto é, a diferente distribuição) dos elétrons. Os nêutrons, os prótons e os elétrons são, na realidade, de tamanho mínimo em relação ao átomo como um todo; neste esquema, os seus tamanhos estão em tamanho maior.

tável carbono 12, com seis prótons e seis nêutrons, também existe uma pequena quantidade de um isótopo instável, o carbono 14, que é radioativo e cujos átomos têm seis prótons e oito nêutrons. O carbono 14 tem um decaimento radioativo com um ritmo baixo, mas constante. Essa forma do carbono constitui a base da técnica conhecida como datação de matéria orgânica por carbono 14, de largo uso em arqueologia.

A **massa atômica** de um átomo, ou o **peso molecular** de uma molécula, é a relação entre a sua massa e a massa do átomo de hidrogênio. Ela é essencialmente igual ao número de prótons mais o número de nêutrons que o átomo ou a molécula contém, pois os elétrons são tão leves que sua contribuição para a massa total é praticamente zero. Assim, o principal isótopo de carbono tem um peso molecular de 12 e é simbolizado por ^{12}C, ao passo que o isótopo instável recém-considerado tem um peso atômico de 14 e é escrito como ^{14}C. A massa de um átomo ou molécula é frequentemente especificada em *dáltons* – unidade de massa atômica aproximadamente igual à massa do átomo de hidrogênio.

Os átomos são tão pequenos que é difícil imaginar o seu tamanho. Um átomo de carbono, grosseiramente, possui um diâmetro de 0,2 nm, de maneira que seria preciso uma linha de cerca 5 milhões deles para cobrir uma distância de um milímetro. Um próton, ou nêutron, pesa aproximadamente $1/(6 \times 10^{23})$ gramas. O hidrogênio, tendo apenas um próton, tem massa atômica igual a 1, de modo que um grama de hidrogênio contém 6×10^{23} átomos. No caso do carbono, com um número atômico de 12, 12 gramas de carbono contém 6×10^{23} átomos. Esse número enorme (6×10^{23}, denominado **Número de Avogadro**) é o fator-chave da escala que descreve as relações entre as quantidades geralmente usadas na vida quotidiana e as quantidades em termos de átomos ou moléculas individuais. Se uma substância tem um peso molecular de M, uma massa de M gramas dessa substância conterá 6×10^{23} moléculas dessa substância. Essa quantidade é chamada de um *mol* de substância (**Figura 2-3**). O conceito de mol é amplamente usado na química como uma maneira de representar o número de moléculas disponíveis para participar das reações químicas.

Existem 92 elementos de ocorrência natural, cada um deles diferindo dos demais pelo número de prótons e elétrons de seus átomos. Os organismos vivos, entretanto, são formados apenas por um grupo selecionado desses elementos, mas apenas quatro deles – carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e oxigênio (O) – perfazem 96,5% do peso dos organismos vivos. Essa composição difere grandemente daquela do ambiente inorgânico não vivo (**Figura 2-4**) e é uma das evidências de um tipo de química muito particular.

Um mol é X gramas de uma substância, onde X é sua massa molecular relativa (peso molecular). Um mol contém 6×10^{23} moléculas da substância.

1 mol de carbono pesa 12 g
1 mol de glicose pesa 180 g
1 mol de cloreto de sódio pesa 58 g

Uma solução molar tem uma concentração de 1 mol de substância por litro de solução. Uma solução molar (1 M) de glicose, por exemplo, tem 180 g/L, e uma solução milimolar (1 mM) tem 180 mg/L.

A abreviação-padrão para grama é g; a abreviação para litro é L.

Figura 2-3 **O que é um mol?** Alguns cálculos simples de moles e soluções molares.

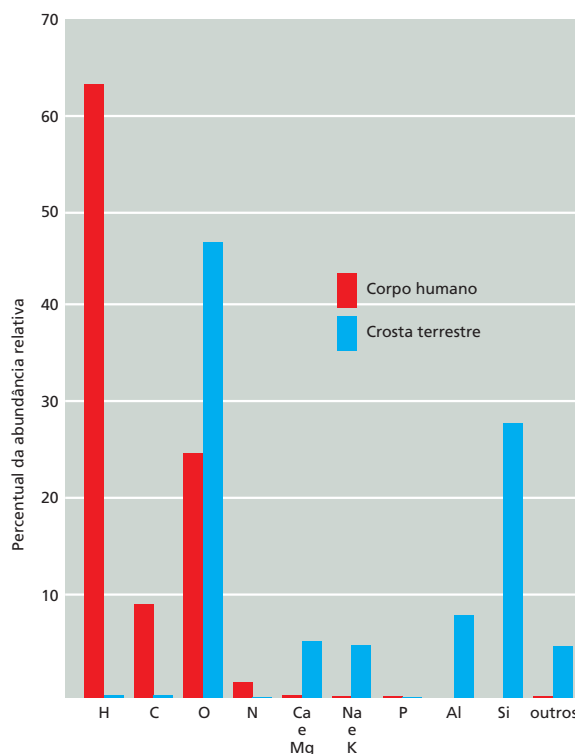
Os elétrons da camada mais externa determinam como os átomos interagem

Para entender como os átomos se ligam entre si para formar as moléculas que compõem os organismos vivos, devemos estar atentos aos seus elétrons. Prótons e elétrons são mantidos firmemente unidos uns aos outros no núcleo e trocam de parceiro somente em condições extremas, por exemplo, durante o decaimento radioativo ou no interior do sol ou ainda no interior de um reator nuclear. Nos tecidos vivos, apenas os elétrons dos átomos sofrem rearranjos. Eles formam o exterior dos átomos e determinam as regras da química segundo as quais os átomos se combinam, formando moléculas.

Os elétrons estão permanentemente se movimentando ao redor do núcleo. Entretanto, a motilidade nesse nível submicroscópico obedece a leis diferentes daquelas com que se está acostumado na vida quotidiana. Essas leis determinam que, em um átomo, os elétrons só podem existir em certos estados discretos – falando grosseiramente, em órbitas discretas – e determinam também que há um limite finito no número de elétrons que podem ser acomodados em determinado tipo de orbital, que é denominado também *camada eletrônica.* Aqueles elétrons que, em média, estão mais próximos do núcleo (que têm carga positiva) são atraídos mais fortemente pelo núcleo, ocupam a região mais interna e estão ligados à camada eletrônica mais firmemente. Essa camada pode ter apenas, no máximo,

Figura 2-4 A distribuição de elementos na crosta terrestre difere radicalmente da distribuição nos tecidos animais. A abundância de cada elemento está expressa como porcentagem do número total de átomos presentes nas amostras biológica e geológica, inclusive água. Assim, por exemplo, mais de 60% dos átomos de um ser vivo são átomos de hidrogênio. A abundância relativa dos elementos é semelhante em todos os seres vivos.

QUESTÃO 2-1

Uma xícara de água contendo exatamente 18 g, ou 1 mol, de água foi esvaziada no Mar Egeu há 3.000 anos. Qual seria a chance de a mesma quantidade de água, tirada do Oceano Pacífico hoje, incluir uma dessas moléculas de água "gregas"? Considere uma mistura perfeita e que o volume aproximado dos oceanos da terra seja de 1,5 bilhão de quilômetros cúbicos ($1,5 \times 10^9$ km^3).

dois elétrons. A segunda camada está mais afastada do núcleo, seus elétrons estão ligados menos firmemente, essa segunda camada pode conter até oito elétrons. A terceira camada possui elétrons ligados ao núcleo ainda menos firmemente e também pode ter até oito elétrons. A quarta e a quinta camadas podem conter 18 elétrons cada uma. A presença de átomos com mais do que quatro camadas é muito rara nas moléculas biológicas.

O arranjo eletrônico de um átomo é mais estável quando todos os seus elétrons estão em um estado no qual possam ligar-se o mais firmemente possível, isto é, quando ocupam a camada mais interna, próximos do núcleo de carga positiva. Portanto, exceto no caso de átomos muito grandes, os elétrons de um átomo preenchem os orbitais ordenadamente: a primeira camada antes da segunda, a segunda antes da terceira e assim por diante. Átomos cuja camada mais externa esteja preenchida completamente por elétrons são particularmente estáveis e, portanto, quimicamente inertes. São exemplos o hélio, que possui dois elétrons (e, portanto, número atômico 2), o neônio, que possui 2 + 8 (número atômico 10), e o argônio, que possui 2 + 8 + 8 (número atômico 18). Todos esses três elementos são gases inertes. De maneira oposta, o hidrogênio, que possui apenas um elétron e, consequentemente, apenas meia camada preenchida, é extremamente reativo. Todos os átomos encontrados nos tecidos vivos possuem suas camadas eletrônicas mais externas incompletas e assim são capazes de doar, aceitar ou compartilhar elétrons uns com os outros formando moléculas (Figura 2-5).

Uma vez que as camadas eletrônicas não totalmente preenchidas são menos estáveis do que as camadas totalmente preenchidas, os átomos que possuem uma camada mais externa incompleta têm uma tendência maior a interagirem com outros átomos de modo a ganharem ou perderem certo número de elétrons para completarem a camada eletrônica mais externa. Essa troca de elétrons pode ocorrer tanto por transferência de elétrons de um átomo a outro quanto pelo compartilhamento de elétrons entre dois átomos. Essas duas estratégias levam a dois tipos de **ligações químicas** que ligam os átomos uns aos outros. Quando elétrons são doados de um átomo a outro, ocorre a formação de uma *ligação iônica;* quando dois átomos compartilham um mesmo par de elétrons, há a formação de uma *ligação covalente* (Figura 2-6). Frequentemente, no caso de ligações

	Elemento	I	II	III	IV
1	Hidrogênio	●			
2	Hélio	●●			
6	Carbono	●●	●●●●		
7	Nitrogênio	●●	●●●●●		
8	Oxigênio	●●	●●●●●●		
10	Neônio	●●	●●●●●●●●		
11	Sódio	●●	●●●●●●●●	●	
12	Magnésio	●●	●●●●●●●●	●●	
15	Fósforo	●●	●●●●●●●●	●●●●●	
16	Enxofre	●●	●●●●●●●●	●●●●●●	
17	Cloro	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●	
18	Argônio	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●	
19	Potássio	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●	●
20	Cálcio	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●	●●

Figura 2-5 A reatividade química de um elemento se baseia em como sua camada eletrônica mais externa está preenchida. Todos os elementos geralmente encontrados nos seres vivos têm suas camadas eletrônicas mais externas incompletas (*vermelho*) de modo que eles podem participar de reações químicas com outros átomos. Os gases inertes (*amarelo*), diferentemente, têm apenas camadas completas e não reagem quimicamente.

covalentes, o compartilhamento do par de elétrons não é equitativo, de modo que um dos átomos pode atrair os elétrons compartilhados mais do que o outro átomo; isso resulta em *ligação covalente polar,* que será vista mais adiante.

O átomo de H, que precisa de somente mais um elétron para completar sua camada, geralmente adquire este elétron por compartilhamento. Com isso, forma uma ligação covalente com algum outro átomo que, em muitos casos, é uma ligação covalente polar. Nas células vivas, os átomos que geralmente completam suas respectivas camadas mais externas de oito elétrons por compartilhamento de elétrons, formando ligações covalentes, são o C, o N e o O (possuem a segunda camada incompleta), e o P e o S (possuem a terceira camada incompleta) (ver Figura 2-5) e, desse modo, geralmente compartilham elétrons para terem a última camada com oito elétrons, formando assim ligações covalentes. O número de elétrons que um átomo adquire ou perde, tanto por compartilhamento quanto por transferência, para completar sua camada mais externa determina o número de ligações que um átomo pode formar.

Uma vez que o estado da camada mais externa determina as propriedades químicas de um elemento, quando os elementos são listados pela ordem crescente de seus números atômicos, observa-se uma periodicidade recorrente de elementos com propriedades semelhantes. Um elemento que tem a segunda camada incompleta contendo um elétron se comporta praticamente da mesma maneira que um elemento que tem sua segunda camada totalmente preenchida e a terceira camada incompleta também contendo um elétron. Os metais, por exemplo, têm suas camadas mais externas incompletas, contendo apenas um ou poucos elétrons, ao passo que, como foi visto, os gases inertes contêm suas camadas mais externas totalmente preenchidas. Essa organização deu origem à famosa *tabela periódica* dos elementos, que está esboçada na **Figura 2-7**, onde os elementos encontrados nos organismos vivos estão ressaltados.

QUESTÃO 2-2

Um átomo de carbono contém seis prótons e seis nêutrons.

A. Quais são os seus número atômico e peso atômico?
B. Quantos elétrons ele possui?
C. Quantos elétrons a mais ele necessita para completar sua camada mais externa? Como isso afeta o comportamento químico do carbono?
D. O carbono com número atômico 14 é radioativo. Em que sua estrutura difere do carbono não radioativo? Em que essa diferença afeta o seu comportamento químico?

Figura 2-6 Os átomos podem atingir uma organização mais estável de elétrons na camada mais externa pela interação com outro átomo. Uma ligação covalente é formada quando elétrons são compartilhados entre átomos. Uma ligação iônica é formada quando elétrons são transferidos de um átomo a outro. Os dois casos mostrados representam extremos; frequentemente, ligações covalentes se formam com uma transferência parcial (compartilhamento desigual de elétrons), resultando em uma ligação covalente polar (ver, por exemplo, Figura 3-11).

Figura 2-7 O ordenamento dos elementos pelos seus números atômicos forma a tabela periódica. Os elementos se enquadram em grupos que apresentam propriedades semelhantes com base no número de elétrons que cada elemento possui em sua camada mais externa. Átomos posicionados na mesma coluna vertical devem ganhar (ou perder) o mesmo número de elétrons para completarem sua camada mais externa e assim se comportam de maneira semelhante na formação ou ligação de íon. Dessa maneira, Mg e Ca tendem a doar os dois elétrons de suas camadas mais externas.

Os quatro elementos ressaltados em *vermelho* constituem 99% do total do número de átomos presentes no corpo humano. Os sete elementos ressaltados em *azul*, em conjunto, representam 0,9% do total. Para o homem, são necessários traços de outros elementos, mostrados em *verde*. Permanece por ser esclarecido se os elementos mostrados em *amarelo* são essenciais ou não para os seres humanos. A química da vida, parece, é então predominantemente a química dos elementos mais leves.

Os pesos atômicos, dados pela soma dos prótons e nêutrons do núcleo do átomo, podem variar de acordo com determinado isótopo do elemento. Os pesos atômicos mostrados são aqueles do isótopo mais comum de cada elemento.

As ligações iônicas são formadas por ganho e perda de elétrons

As ligações iônicas são geralmente formadas por átomos que têm apenas um ou dois elétrons na camada mais externa, portanto incompleta, ou faltando apenas um ou dois elétrons para completarem a camada mais externa. Frequentemente, esses átomos conseguem completar suas camadas mais externas com mais facilidade, não pelo compartilhamento de elétrons, mas pela transferência de elétrons para outro átomo ou então por receberem elétrons de outro átomo. Por exemplo, pode-se ver na Figura 2-5 que o átomo de sódio (Na), que tem número atômico 11, pode se descamar, deixando, então, sua camada mais externa completa ao doar o único átomo dessa camada. De maneira oposta, o átomo de cloro (Cl), com número atômico 17, pode completar sua camada mais externa ganhando apenas um elétron. Consequentemente, se um átomo de Na encontra um átomo de Cl, um elétron pode saltar do Na para o Cl, de modo que os dois átomos ficarão com suas respectivas camadas mais externas completas. O resultado desse casamento entre o sódio, um metal macio e extremamente reativo, e o cloro, um gás tóxico de cor verde, é o sal de cozinha (NaCl).

Quando um elétron pula do Na para o Cl, ambos os átomos se tornam **íons** eletricamente carregados. O átomo de Na, que perdeu um elétron, possui agora um elétron a menos do que o número de prótons no núcleo. Portanto, ele tem uma carga positiva (Na^+). O átomo de Cl, que ganhou um elétron, tem agora um elétron a mais do que o número deprótons, ficando com uma carga negativa (Cl^-). Os íons positivos são denominados *cátions,* e os íons negativos são denominados *ânions.* Os íons também podem ser classificados pelo número de elétrons que perdem ou ganham. Assim, o Na e o potássio (K) possuem um elétron que pode ser perdido e formam cátions com uma só carga positiva (Na^+ e K^+), ao passo que o magnésio e o cálcio possuem dois elétrons que podem ser perdidos, sendo capazes, portanto, de formarem cátions com duas cargas positivas (Mg^{2+} e Ca^{2+}).

Em virtude das suas cargas opostas, Na^+ e Cl^-, são atraídos entre si de modo a se manterem unidos por meio de uma **ligação iônica**. Um cristal de sal contém um número astronômico de Na^+ e Cl^- mantidos em uma estrutura tridimensional bem precisa na qual as cargas opostas estão perfeitamente balanceadas. Um cristal de apenas 1 mm contém cerca de 2×10^{19} íons de cada tipo (**Figura 2-8**). Substâncias como o NaCl, nas quais os átomos são mantidos unidos apenas por ligações iônicas, são geralmente denominadas *sais* e não moléculas.

A ligação iônica é um tipo de **atração eletrostática** – uma força de atração que ocorre entre átomos com cargas opostas (ver Painel 2-7, p. 76-77). Em virtude da interação favorável que há entre íons e moléculas de água (que são polares), muitos sais (inclusive o NaCl) são altamente solúveis em água. Eles se dissociam nos íons individualizados (como Na^+ e Cl^-), cada um deles sendo rodeado por um grupo de moléculas de água. Posteriormente, neste mesmo capítulo, serão discutidas as atrações eletrostáticas e outras *ligações não covalentes* que podem existir entre os átomos.

Figura 2-8 O cloreto de sódio é mantido unido por meio da formação de uma ligação iônica. (A) Um átomo de sódio (Na) reage com um átomo de cloro (Cl). Os elétrons de cada um dos átomos estão esquematizados de acordo com seus respectivos níveis de energia; os elétrons da camada reativa (incompletamente preenchida) estão mostrados em *vermelho*. A reação ocorre pela transferência de um único elétron do sódio para o cloro, formando dois átomos eletricamente carregados, ou íons, cada um com um jogo de elétrons completo na última camada. Os dois íons de cargas opostas são mantidos unidos por meio de atrações eletrostáticas. (B) O produto da reação entre o sódio e o cloro, cloreto de sódio cristalino, constitui-se de íons de sódio e de cloro muito compactados segundo um arranjo regular no qual as cargas ficam perfeitamente balanceadas. (C) Fotografia colorida de cristais de cloreto de sódio.

As ligações covalentes são formadas por compartilhamento de elétrons

Todas as características de uma célula dependem das moléculas que ela possui. **Moléculas** são um agregado de átomos unidos por meio de **ligações covalentes**, isto é, os átomos que as formam completam suas camadas mais externas por compartilhamento de elétrons, e não por troca de elétrons. Os elétrons compartilhados completam a camada mais externa de ambos os átomos. Na molécula mais simples que pode existir, a molécula de hidrogênio (H_2), dois átomos de H, cada um com seu único elétron, compartilham esses dois elétrons, completando assim suas camadas mais externas. Esses elétrons compartilhados formam uma nuvem de carga negativa que é mais densa na região entre os dois núcleos de carga positiva. Essa densidade de elétrons ajuda a manter os núcleos unidos por opor-se à repulsão mútua entre cargas iguais que, de outro modo, forçaria o afastamento dos átomos. As forças de atração de repulsão estão balanceadas de tal forma que os núcleos ficam afastados um do outro por uma distância característica, chamada de *comprimento de ligação* (**Figura 2-9**).

Enquanto um átomo de H pode formar apenas uma única ligação covalente, os outros átomos que comumente formam ligações covalentes nas células (O, N, S, P e o importantíssimo C) podem formar mais de uma ligação. As camadas mais externas desses átomos, como visto anteriormente, podem acomodar até oito elétrons e, então, formam ligações covalentes com tantos outros elétrons quantos os que forem necessários para atingir esse número. O oxigênio, com seis elétrons na última camada, é mais estável quando adquire dois elétrons extras pelo compartilhamento com outros átomos; portanto, forma duas ligações covalentes. O nitrogênio, que contém cinco elétrons na camada mais externa, forma um máximo de três ligações covalentes, e o carbono, com quatro elétrons na camada mais externa, forma até quatro ligações covalentes, compartilhando, portanto, quatro pares de elétrons (ver Figura 2-5).

Quando um átomo forma ligações covalentes com vários outros, essas múltiplas ligações têm orientações definidas no espaço, uma em relação a outra,

Figura 2-9 A molécula de hidrogênio é mantida unida por ligação covalente. Cada átomo de hidrogênio, isoladamente, tem apenas um elétron, o que significa que a sua primeira (e única) camada eletrônica está incompletamente preenchida. Ao permanecerem unidos, os dois átomos são capazes de compartilhar os dois elétrons, e assim cada um obtém uma primeira camada completamente preenchida, com os elétrons, adotando órbitas modificadas ao redor do núcleo. A ligação covalente entre os dois átomos tem um comprimento definido. Se os átomos estiverem próximos demais, os núcleos positivos repelirão um ao outro. Se estiverem mais afastados do que essa distância, eles não terão a capacidade de compartilharem elétrons de forma tão eficaz.

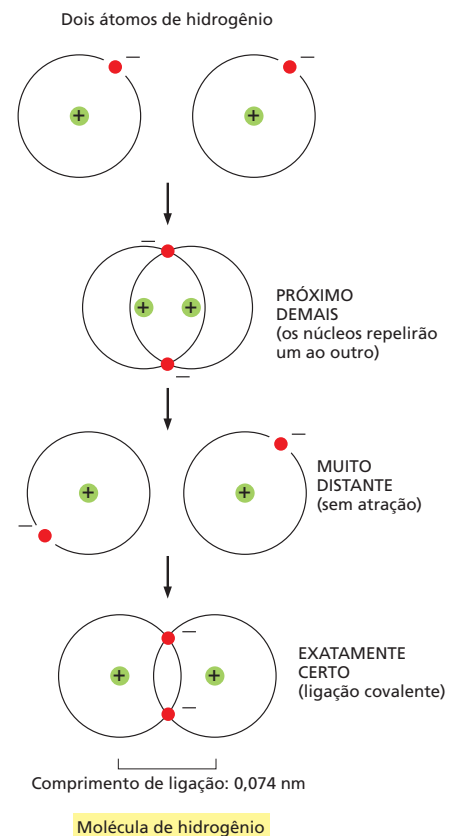
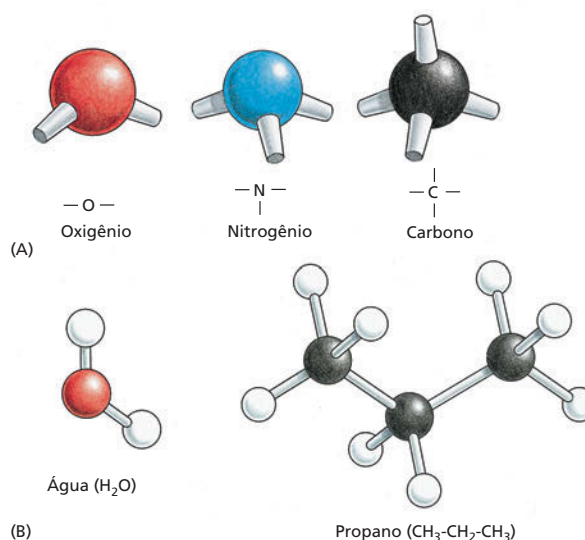



Figura 2-10 As ligações covalentes são caracterizadas por geometrias particulares. (A) Os arranjos espaciais das ligações covalentes que podem ser formados pelo oxigênio, pelo nitrogênio e pelo carbono. (B) As moléculas formadas por esses átomos têm uma estrutura tridimensional precisa definida pelo ângulo e pelo comprimento de cada ligação covalente. A molécula de água, por exemplo, tem a forma de "V" com um ângulo próximo de 109°. Nesses modelos esfera-bastão, as *esferas coloridas* são os átomos, e os *bastões*, as ligações covalentes. As cores tradicionalmente usadas para representar os diferentes átomos – *preto* para o carbono, *branco* para o hidrogênio, *azul* para o nitrogênio e *vermelho* para o oxigênio – foram estabelecidas pelo químico August Wilhelm Hofmann em 1865, quando ele usou um conjunto de bolas usadas em jogo de croqué para fazer modelos moleculares para uma palestra pública sobre o "poder combinado" dos átomos.

refletindo a direção das órbitas dos elétrons compartilhados. Em virtude disso, as ligações covalentes entre vários átomos são caracterizadas tanto pelos ângulos de ligações específicos quanto pelo comprimento de ligação e energia de ligação (**Figura 2-10**). As quatro ligações covalentes que podem se formar ao redor de um átomo de carbono, por exemplo, estão organizadas como que apontando para os quatro cantos de um tetraedro regular. A precisão da orientação das ligações covalentes ao redor do átomo de carbono se constitui na base da geometria tridimensional das moléculas orgânicas.

As ligações covalentes variam em intensidade

As ligações covalentes entre dois átomos possuem comprimentos caraterísticos que dependem dos átomos envolvidos. Uma outra propriedade crucial de qualquer ligação (covalente ou não covalente) é a sua intensidade. A *intensidade de ligação* é medida pela quantidade de energia que deve ser gasta para romper a ligação; geralmente, essa energia é expressa tanto em unidades de quilocalorias por mol (kcal/mol) ou de quilojaules por mol (kJ/mol). Uma quilocaloria é a quantidade de energia necessária para elevar em um grau centígrado a temperatura de um litro de água. Assim, se, para romper 6×10^{23} ligações de determinado tipo (isto é, um mol de ligações), é necessário empregar 1 quilocaloria, a intensidade dessa ligação é 1 kcal/mol. A outra unidade (kJ/mol), derivada das unidades SI (Système Internationale d'Unités), é empregada universalmente pelos físicos e aceita cada vez mais pelos biólogos celulares. Uma quilocaloria equivale a cerca de 4,2 quilojaules. A intensidade e o comprimento típicos das principais classes de ligações químicas estão apresentados na **Tabela 2-1**.

Para se ter uma ideia do que significa intensidade de ligação, é útil compará-la com a energia média dos impactos que as moléculas sofrem constantemente quando colidem com outras moléculas que estejam presentes no mesmo ambiente em que elas se encontram (energia cinética ou calor). Ligações covalentes típicas são 100 vezes mais intensas do que as energias cinéticas, de modo que elas resistem ao rompimento pela energia cinética e, normalmente, só são rompidas por reações químicas específicas com outras moléculas. A formação e a quebra de ligações covalentes são eventos violentos e, nas células vivas, são controladas cuidadosamente por catalisadores altamente específicos, chamados de *enzimas.* Como regra, as ligações não covalentes são muito mais fracas. Como será visto mais adiante, elas têm enorme importância para as células em muitas situações nas quais, para cumprirem suas funções, as moléculas devem associar-se e dissociar-se.

TABELA 2-1 Comprimento e intensidade nas ligações químicas

Tipo de ligação		Comprimento (nm)	Intensidade (kcal/mol)	
			no vácuo	na água
Covalente		0,15	90 (377)**	90 (377)
Não covalente:	ligação iônica*	0,25	80 (335)	3 (12,6)
	ligação de hidrogênio	0,30	4 (16,7)	1 (4,2)
	atração de van der Waals (por átomo)	0,35	0,1 (0,4)	0,1 (0,4)

* Ligação iônica é uma atração eletrostática entre dois átomos totalmente carregados.
** Os valores em parênteses estão em kJ/mol. 1 caloria = 4,184 j.

Tabela 2-1 Ligações químicas covalentes e não covalentes têm comprimentos e intensidades diferentes. A intensidade de uma ligação é medida pela energia necessária para romper a ligação, em quilocalorias ou quilojaules por mol (ver o Glossário para as definições dessas unidades). O comprimento de uma ligação de hidrogênio X-H-X é definido como a distância entre os dois átomos que não o hidrogênio (X). As intensidades e os comprimentos das ligações listadas são aproximados, porque os valores exatos dependem dos átomos envolvidos. Os diferentes tipos de ligações não covalentes são descritos mais adiante neste mesmo capítulo (ver Painel 2-7, p. 76-77).

Existem diferentes tipos de ligações covalentes

Muitas ligações covalentes envolvem o compartilhamento de dois elétrons, cada um doado por um dos átomos participantes. Essas são denominadas *ligações simples.* Algumas ligações covalentes, entretanto, envolvem o compartilhamento de mais de um par de elétrons. Quatro elétrons podem ser compartilhados, por exemplo, dois vindos de cada um dos átomos participantes. Esse tipo de ligação é denominado *ligação dupla.* As ligações duplas são mais curtas e mais fortes do que as ligações simples e têm um efeito característico sobre a geometria tridimensional das moléculas que as contêm. Uma ligação covalente simples entre dois átomos geralmente permite a rotação, ao redor do eixo de ligação, de uma parte da molécula em relação à outra. Uma ligação dupla impede tal rotação, produzindo um arranjo de átomos mais rígido e menos flexível (**Figura 2-11**). Essa restrição tem influência fundamental sobre a forma tridimensional de muitas macromoléculas. O **Painel 2-1** (p. 64-65) revisa as ligações químicas mais encontradas nas moléculas biológicas.

Algumas moléculas possuem átomos compartilhando elétrons de tal forma que produzem ligações com um caráter intermediário entre a ligação simples e a ligação dupla. Por exemplo, a molécula do benzeno, que é altamente estável, é formada por um anel de seis átomos de carbono onde os elétrons das ligações estão distribuídos uniformemente (embora, algumas vezes, o arranjo seja representado por um esquema como uma sequência alternada de ligações simples e ligações duplas, como pode ser visto no Painel 2-1).

Quando os átomos que são unidos através de uma ligação covalente simples pertencem a elementos diferentes, os dois átomos geralmente atraem os elétrons compartilhados com graus diferentes. Por exemplo, comparados com o átomo de C, os átomos de O e N atraem elétrons mais fortemente, ao passo que o átomo de H atrai elétrons mais fracamente, em virtude das diferenças relativas entre as cargas positivas que possuem nos seus núcleos. Por definição, uma estrutura **polar** (no sentido elétrico) é uma estrutura com uma carga positiva que se concentra ao redor de uma das extremidades de uma molécula (o polo positivo) e uma carga negativa que se concentra ao redor da outra extremidade (o polo negativo). Por isso, as ligações covalentes nas quais os elétrons são compartilhados de maneira não equitativa são conhecidas como ligações covalentes polares. Por exemplo, a ligação covalente entre oxigênio e hidrogênio, –O–H, ou entre nitrogênio e hidrogênio, –N–H, é polar (**Figura 2-12**), ao passo que naquela entre carbono e hidrogênio, –C–H, os elétrons são atraídos pelos átomos de maneira muito mais equitativa, e ela é relativamente não polar.

(A) Etano

(B) Eteno

Figura 2-11 As ligações duplas carbono-carbono são mais curtas e mais rígidas do que as ligações simples carbono-carbono. (A) A molécula de etano, que tem uma ligação covalente simples entre os dois átomos de carbono, ilustra o arranjo tetraédrico das ligações simples formadas pelo carbono. Um dos grupos CH_3 ligados pela ligação covalente pode girar, em relação ao outro grupo, ao redor do eixo da ligação. (B) Ligação dupla entre dois átomos de carbono da molécula de eteno (etileno) altera a geometria da ligação dos átomos de carbono e mantém todos os átomos em um mesmo plano (*azul*); a ligação dupla impede a rotação de um grupo CH_2 em relação ao outro.

Nas células, atrações eletrostáticas ajudam a manter as moléculas unidas

Em soluções aquosas, as ligações covalentes são de 10 a 100 vezes mais intensas do que as demais forças de atrações entre átomos, possibilitando conexões que de-

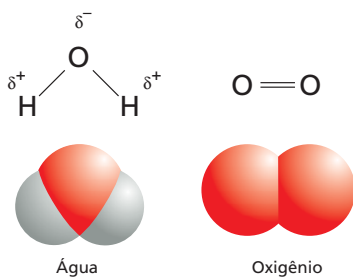



Figura 2-12 Na ligação covalente polar, os elétrons são compartilhados de maneira desigual. Comparação entre a distribuição dos elétrons em uma molécula polar como a água (H_2O) e uma molécula apolar como o oxigênio (O_2); δ^+ indica uma carga positiva parcial e δ^- indica uma carga negativa parcial.

finem os limites entre uma molécula e outra. Entretanto, muito da biologia depende da ligação específica de diferentes moléculas entre si. Essa ligação é mediada por um conjunto de atrações não covalentes que individualmente são fracas, mas suas energias somadas criam uma força efetiva entre as duas moléculas. Anteriormente, foram descritas as ligações iônicas que mantêm juntos os íons Na^+ e Cl^- no cristal de sal. As atrações eletrostáticas são mais fortes quando os átomos envolvidos são totalmente carregados, como Na^+ e Cl^-. Entretanto, atrações eletrostáticas fracas também ocorrem entre moléculas que contenham ligações polares covalentes.

Ligações covalentes polares são, portanto, extremamente importantes na biologia porque elas possibilitam que as moléculas interajam por meio de forças elétricas. Qualquer molécula grande que tenha muitos grupos polares terá um padrão de cargas positivas e negativas na sua superfície. Quando uma molécula dessas encontra uma segunda molécula com um conjunto de cargas complementares, as duas atrairão uma a outra por uma atração eletrostática que se assemelha (embora mais fraca) às ligações iônicas que mantêm unidos os sais como o NaCl. Quando uma quantidade suficiente dessas ligações não covalentes fracas se formarem entre duas moléculas grandes, as suas superfícies se grudarão de maneira específica (ilustrado na **Figura 2-13**). Entretanto, no ambiente biológico, a água reduz enormemente o grau de atração entre essas cargas.

QUESTÃO 2-3

Discuta se a afirmação seguinte é verdadeira: "Uma ligação iônica pode, em princípio, ser considerada como uma ligação covalente muito polar. Assim, ligações covalentes polares caem em algum ponto entre a ligação iônica de um lado do espectro e a ligação covalente apolar do lado oposto".

A água é mantida unida por meio de ligações de hidrogênio

A água perfaz cerca de 70% do peso de uma célula, e a maioria das reações intracelulares ocorre em ambiente aquoso. Sabe-se que a vida na Terra começou nos oceanos, e as condições daquele ambiente primitivo determinaram características indeléveis na química dos seres vivos. Portanto, a vida depende das propriedades da água.

Nas moléculas de água (H_2O), os dois átomos de H se ligam ao átomo de O por ligações covalentes. As duas ligações são altamente polares porque O atrai fortemente os elétrons, e H os atrai fracamente. Consequentemente, há uma distribuição de elétrons não equitativa, com predominância de carga positiva nos dois átomos de H e de carga negativa no átomo de O (ver Figura 2-12). Quando, em uma molécula de água, uma região carregada positivamente (isto é, um dos seus átomos de H) se aproxima de uma região carregada negativamente (isto é, o átomo de O) por uma segunda molécula de água, a atração elétrica entre elas estabelece uma ligação fraca denominada **ligação de hidrogênio**. Essas ligações são muito mais fracas do que as ligações covalentes e são facilmente rompidas pelo energia cinética aleatória que resulta da energia calorífica das moléculas. Essas ligações, portanto, existem apenas por tempos extremamente curtos. Entretanto, o efeito combinado de um grande número dessas ligações está longe de ser inexpressivo. Cada molécula de água pode formar ligações de hidrogênio por meio de seus dois átomos de H, com duas outras moléculas de água, formando, assim, uma rede na qual as ligações de hidrogênio são rompidas e formadas continuamente. Em virtude dessas ligações entrelaçadas, a água, à temperatura ambiente, é um líquido com alto ponto de ebulição e alta tensão superficial, e não um gás. Sem ligações de hidrogênio, a vida, como a conhecemos, não poderia existir. O significado biológico das propriedades da água é revisado no **Painel 2-2** (p. 66-67).

Figura 2-13 Moléculas grandes, como as proteínas, podem ligar-se umas às outras por meio de cargas complementares nas suas superfícies.

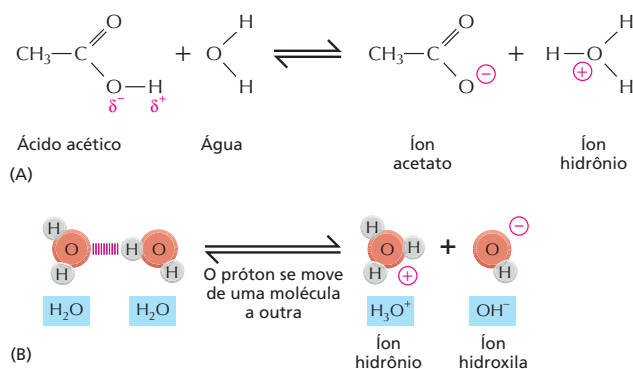
Nem todos os átomos de hidrogênio formam ligações de hidrogênio. Geralmente, há formação de uma ligação de hidrogênio quando um H carregado positivamente (unido à molécula por ligação covalente polar) fica próximo a um átomo de carga negativa (normalmente oxigênio ou nitrogênio) pertencente a uma outra molécula. Ligações de hidrogênio podem também ocorrer entre diferentes partes de uma mesma molécula grande, ajudando, assim, a criar formas especiais. A ligação de hidrogênio é apenas um dos membros da família de ligações não covalentes fracas que são importantes para fazer com que as grandes moléculas se arranjem de forma única e se liguem seletivamente a outras moléculas, como será discutido posteriormente neste capítulo.

Moléculas como os alcoóis que possuem ligações covalentes polares que podem formar ligações de hidrogênio com a água se misturam facilmente em

água. Igualmente, como foi mencionado, moléculas que possuem cargas positivas ou negativas (íons) se dissolvem facilmente na água. Essas moléculas são denominadas **hidrofílicas**, para indicar que são moléculas que "gostam de água". Uma proporção muito grande das moléculas presentes no ambiente aquoso das células, incluindo os açúcares, o DNA, o RNA e a maioria das proteínas, forçosamente, pertence a essa categoria. Moléculas **hidrofóbicas** (moléculas que "não gostam de água") são não carregadas e formam poucas ou nenhuma ligação de hidrogênio; portanto, não se dissolvem em água. Os hidrocarbonetos são um exemplo importante de constituinte celular hidrofóbico (ver Painel 2-1, p. 64-65). Os átomos de H, nessas moléculas, são unidos covalentemente a átomos de C por meio de ligações grandemente não polares. Uma vez que os átomos de H praticamente não possuem qualquer carga positiva, eles não podem formar ligações de hidrogênio efetivas com outras moléculas. Isso torna os hidrocarbonetos completamente hidrofóbicos, propriedade que é aproveitada pelas células, cujas membranas, como será visto no Capítulo 11, são formadas por moléculas que possuem longas caudas hidrocarbonadas. Em virtude do fato de não se dissolverem em água, os hidrocarbonetos (hidrofóbicos) podem formar finas barreiras de membranas que mantêm o interior aquoso das células separados do meio circundante também aquoso.

Na água, algumas moléculas polares formam ácidos e bases

Um dos tipos de reações químicas mais simples que existe, e de suma importância para as células, ocorre quando uma molécula que possui alguma ligação covalente altamente polar entre um hidrogênio e um segundo átomo se dissolve em água. O átomo de hidrogênio dessa molécula doa quase que totalmente seu elétron para o átomo que estiver associado a ele e, assim, existe como um núcleo de hidrogênio praticamente despido de elétrons; portanto, na forma de um núcleo de hidrogênio carregado positivamente, em outras palavras, um *próton (H^+).* Quando uma molécula polar é rodeada por moléculas de água, o próton é atraído pela carga negativa parcial do átomo de O de uma molécula de água adjacente. Esse próton pode separar-se da molécula original e associar-se a átomos de oxigênio de moléculas de água gerando um **íon hidrônio (H_3O^+)** (Figura 2-14A). A reação inversa também ocorre muito prontamente. Dessa forma, deve-se imaginar um estado de equilíbrio em que bilhões de prótons estão continuamente zanzando de uma à outra das moléculas de água da solução.

As substâncias que, ao se dissolverem em água, liberam prótons, formando H_3O^+, são denominadas **ácidos**. Quanto maior a concentração de H_3O^+, mais ácida é a solução. O H_3O^+ está presente mesmo na água pura (a uma concentração de 10^{-7} M) em virtude do movimento dos prótons entre as moléculas de água (Figura 2-14B). Por tradição, a concentração de H_3O^+ é normalmente referida como concentração de H^+, embora quase todo o H^+ presente em uma solução aquosa esteja na forma de H_3O^+. Para evitar o uso de números inconvenientes para trabalhar, a concentação de H_3O^+ é expressa usando-se uma escala logarítmica denominada **escala de pH**, como está ilustrado no Painel 2-2. A água pura tem pH 7,0 e, portanto, é neutra, isto é nem ácida (pH< 7) nem básica (pH> 7).

QUESTÃO 2-4

O que, se é que há algo, está errado na seguinte afirmação: "Quando o NaCl é dissolvido em água, as moléculas de água mais próximas dos íons tendem a orientar-se preferencialmente de maneira que seus átomos de oxigênio se voltam para os íons sódio e se viram contra os íons cloreto". Explique a resposta.

$CH_3-C(=O)-O^{\delta-}-H^{\delta+}$ + H_2O ⇌ $CH_3-C(=O)-O^-$ + H_3O^+

Ácido acético | Água | Íon acetato | Íon hidrônio

(A)

H_2O + H_2O ⇌ H_3O^+ + OH^-

O próton se move de uma molécula a outra

Íon hidrônio | Íon hidroxila

(B)

Figura 2-14 Os prótons estão em movimento nas soluções aquosas. (A) Reação que ocorre quando uma molécula de ácido acético se dissolve em água. Em pH 7,0, praticamente todo o ácido acético está presente como íon acetato. (B) As moléculas de água permanecem continuamente trocando prótons entre si, formando íons hidrônio e hidroxila. Por sua vez, esses íons se recombinam rapidamente, formando moléculas de água.

Os ácidos são caracterizados como fortes ou fracos, dependendo do quão facilmente eles doam prótons para a água. Os ácidos fortes, como o HCl, por exemplo, perdem os prótons muito facilmente. O ácido acético, por outro lado, é um ácido fraco, porque ele tende a manter mais firmemente o seu próton quando dissolvido em água. Muitos dos ácidos importantes para as células, moléculas que contêm grupo carboxila (COOH), são ácidos fracos (ver Painel 2-2, p. 66-67). A tendência que possuem em se dissociarem apenas com certa relutância é uma característica útil, pois torna a superfície de grandes moléculas sensíveis ao ambiente celular.

Uma vez que os prótons de um íon hidrônio podem passar facilmente para muitos dos tipos de moléculas presentes nas células, alterando suas propriedades, a concentração intracelular de H_3O^+ (a acidez) deve ser regulada muito estritamente. Ácidos, especialmente ácidos fracos, doarão seus prótons muito mais facilmente se a concentração de H_3O^+ da solução for baixa e tenderão a receber os prótons de volta caso a concentração de H_3O^+ seja alta.

Base é o oposto de ácido. Qualquer molécula capaz de receber prótons é chamada de base. Exatamente assim como a propriedade que define um ácido é sua tendência de doar prótons para moléculas de água aumentando a concentração de íons H_3O^+, a propriedade que define uma base é sua capacidade de aumentar a concentração de íons hidroxila (OH^-) pela remoção de prótons das moléculas de água. Desse modo, o hidróxido de sódio (NaOH) é uma base (o termo *alcalino* também é usado), porque, em soluções aquosas, ele se dissocia para formar íons Na^+ e íons OH^-. Em virtude do fato de o NaOH dissociar-se facilmente em água, ele é uma base forte. Entretanto, mais importante ainda para as células são as bases fracas, aquelas que têm uma tendência fraca e reversível de aceitar prótons da água. Muitas bases fracas biologicamente importantes possuem o grupo amino (NH_2). Esse grupo pode gerar OH^- por pegar um próton da água: $-NH_2 + H_2O \rightarrow -NH_3^+ + OH^-$ (ver Painel 2-2, p. 66-67).

QUESTÃO 2-5

A. Existe algum íon $H3O^+$ na água pura em pH neutro (isto é, pH = 7,0)? Se existir, como é que ele é formado?

B. Se é que existe, qual é a relação entre íons H_3O^+ e moléculas de água em pH neutro? (Dica: o peso molecular da água é 18, e 1 L de água pesa 1 kg.)

Em virtude do fato de o íon OH^- combinar-se com um íon H_3O^+ para formar duas moléculas de água, um aumento na concentração de OH^- força uma diminuição na concentração de H_3O^+, e vice-versa. Uma solução de água pura contém uma concentração igual dos dois íons (10^{-7} M); ela não é nem ácida, nem básica e, portanto, é chamada neutra*.* O interior das células também é mantido perto da neutralidade pela presença de **tampões**: ácidos ou bases fracas que podem liberar ou aceitar prótons perto de pH 7, mantendo o ambiente celular relativamente constante sob várias condições.

AS MOLÉCULAS NAS CÉLULAS

Vimos as maneiras pelas quais os átomos se combinam formando moléculas pequenas e como essas moléculas se comportam em ambiente aquoso. Agora serão examinadas as principais classes de moléculas pequenas encontradas nas células e os seus papéis biológicos. Apenas poucas categorias básicas de moléculas, formadas a partir de poucos elementos diferentes, originam toda a extraordinária riqueza de formas e comportamentos que as coisas vivas apresentam.

As células são formadas por compostos de carbono

Deixando de lado a água, praticamente todas as moléculas de uma célula têm o carbono como base. Em comparação com todos os demais elementos, o carbono é inigualável na sua capacidade de formar moléculas grandes. O silício, elemento com a mesma configuração na sua camada eletrônica mais externa, vem em segundo lugar, mas muito atrás. Em virtude do seu pequeno tamanho e do fato de ainda possuir quatro elétrons e quatro vacâncias na última camada, o átomo de carbono pode formar quatro ligações covalentes com outros átomos. Mais importante ainda, um átomo de carbono pode unir-se a outros átomos de carbono através da ligação covalente C-C, que é altamente estável, de modo a compor cadeias e anéis e, assim, formar moléculas grandes e complexas, não

havendo mesmo um limite imaginável para o tamanho das moléculas que podem ser formadas (ver Painel 2-1, p. 64-65). Os compostos de carbono, tanto grandes quanto pequenos, formados pelas células são denominados *moléculas orgânicas.* Opostamente, todas as demais moléculas, inclusive a água, são *inorgânicas.*

Certas combinações de átomos, como as dos grupos metila (–CH_3), hidroxila (–OH), carboxila (–COOH), carbonila (–C=O), fosforila (–PO_3^{2-}) e amino (–NH_2), ocorrem repetidamente nas moléculas orgânicas. Cada um desses **grupos químicos** possui propriedades químicas e físicas distintas que influenciam o comportamento das moléculas que contenham esses grupos, não fazendo diferença se possuem tendência em ganhar ou em perder prótons nem com quais moléculas venham a interagir, por exemplo. A familiaridade com esses grupos e com as suas propriedades químicas simplifica muito a visão que se pode ter da química da vida. Os grupos químicos mais comuns e algumas das suas propriedades estão resumidos no Painel 2-1.

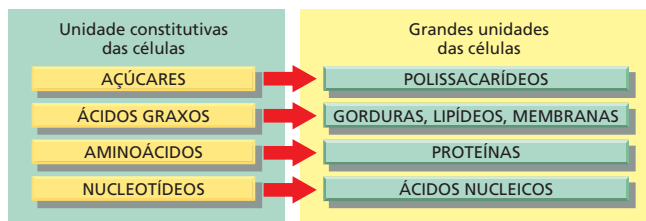
As células contêm quatro famílias principais de moléculas orgânicas pequenas

As moléculas orgânicas pequenas da célula são compostos de carbono e possuem pesos moleculares na faixa entre 100 e 1.000, contendo até 30 ou mais átomos de carbono. Elas são geralmente encontradas livres em solução e têm várias funções. Algumas são utilizadas como subunidades – *monômeros* – para construírem as gigantescas *macromoléculas* poliméricas das células, proteínas, ácidos nucleicos e grandes polissacarídeos. Outras agem como fonte de energia e, no emaranhado de vias metabólicas intracelulares, são degradadas e transformadas em outras moléculas pequenas. Muitas das moléculas pequenas têm mais de um papel na célula, por exemplo, agindo tanto como subunidade de alguma macromolécula quanto como fonte de energia. É importante lembrar que nos seres vivos as moléculas orgânicas pequenas são muito menos abundantes do que as macromoléculas orgânicas. Elas perfazem somente cerca de um décimo do total da massa de matéria orgânica das células (**Tabela 2-2**). Em uma célula, grosseiramente, pode existir cerca de mil tipos diferentes de moléculas pequenas.

Todas as moléculas orgânicas são sintetizadas – e degradadas – a partir de um mesmo conjunto de compostos simples. Tanto a síntese quanto a degradação dessas moléculas ocorrem por meio de sequências de modificações químicas que são limitadas quanto à variedade e que seguem regras bem definidas. Consequentemente, os compostos presentes nas células são quimicamente relacionados e podem ser classificados em um pequeno grupo de famílias distintas. De maneira geral, as células contêm quatro famílias principais de moléculas orgânicas pequenas: os *açúcares,* os *ácidos graxos,* os *aminoácidos* e os *nucleotídeos* (**Figura 2-15**). Embora muitos dos compostos presentes nas células não se enquadrem nessas categorias, essas quatro famílias de moléculas orgânicas

TABELA 2-2 Composição química aproximada de uma célula bacteriana

	Porcentagem do peso da célula	Número de tipos de cada molécula
Água	70	1
Íons inorgânicos	1	20
Açúcares e precursores	1	250
Aminoácidos e precursores	0,4	100
Nucleotídeos e precursores	0,4	100
Ácidos graxos e precursores	1	50
Outras moléculas pequenas	0,2	~300
Macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos)	26	~3.000

Figura 2-15 Os açúcares, os ácidos graxos, os aminoácidos e os nucleotídeos constituem as quatro principais famílias de moléculas orgânicas pequenas encontradas nas células. Eles formam as unidades constitutivas monoméricos, ou subunidades, da maioria das macromoléculas e de outros agregados das células. Alguns deles, como os açúcares e os ácidos graxos, também são fonte de energia.

pequenas, juntamente com as macromoléculas formadas pela ligação entre elas em longas cadeias, correspondem a uma grande proporção da massa celular (ver Tabela 2-2).

Os açúcares são fonte de energia para as células e as subunidades dos polissacarídeos

Os **açúcares** mais simples, os *monossacarídeos,* são compostos que têm a fórmula geral $(CH_2O)_n$, em que *n* é geralmente 3, 4, 5 ou 6. Em virtude dessa fórmula básica, os açúcares e as moléculas formadas a partir deles são denominados *carboidratos.* A glicose, por exemplo, tem a fórmula $C_6H_{12}O_6$ (**Figura 2-16**). Essa fórmula, entretanto, não define completamente a molécula: o mesmo conjunto de carbonos, hidrogênios e oxigênios pode juntar-se em uma mesma molécula por ligações covalentes diferentes, criando estruturas com diversas formas. A glicose, por exemplo, pode ser convertida em açúcares diferentes – manose ou galactose – simplesmente pela troca da orientação, em relação ao resto da molécula, de grupos OH específicos (**Painel 2-3**, p. 68-69). Cada um desses açúcares pode existir em duas formas, chamadas de forma D e de forma L, que são imagens especulares uma da outra. Grupos de moléculas que tenham a mesma fórmula, mas estruturas diferentes, são chamadas de *isômeros,* e o conjunto de moléculas que formam pares especulares é denominado *isômero óptico.* Isômeros são largamente distribuídos entre as moléculas orgânicas em geral, tendo um papel fundamental na geração da enorme variedade de açúcares. Uma visão mais completa da estrutura dos açúcares e de sua química se encontra no Painel 2-3.

Os monossacarídeos podem ser unidos por ligações covalentes, formando, assim, os carboidratos grandes. Dois monossacarídeos ligados entre si formam um dissacarídeo, como a sacarose, que é composta por uma unidade de glicose e uma unidade de frutose. Os grandes polímeros de açúcar variam desde os *oligossacarídeos* (trissacarídeos, tetrassacarídeos e assim por diante) até os gigantescos *polissacarídeos*, que podem conter milhares de unidades monossacarídicas. Na maioria dos casos, o prefixo "oligo-" é usado para indicar macromolé-

Figura 2-16 A estrutura da glicose, um açúcar simples, pode ser representada de diversas maneiras. Nas fórmulas estruturais mostradas em (A), os átomos estão indicados pelos seus símbolos químicos e ligados entre si por linhas sólidas que representam as ligações covalentes. As linhas espessas indicam o plano do anel do açúcar, para enfatizar que os grupos –H e –OH não estão no mesmo plano do anel. (B) Outro tipo de fórmula estrutural que mostra a estrutura tridimensional da glicose na assim denominada "configuração em cadeira". (C) Modelo de esfera-bastão no qual é mostrado o arranjo espacial dos átomos. (D) Um modelo de preenchimento espacial que indica o arranjo tridimensional dos átomos dá uma ideia dos seus tamanhos relativos e do contorno da superfície da molécula. Os átomos em (C) e em (D) estão coloridos da seguinte maneira: C em *preto*, H em *branco*, O em *vermelho*. Essas são as cores que representam esses átomos conforme o código convencionado (ver também Figura 2-10) e será usado ao longo deste livro (**Animação 2.1**).

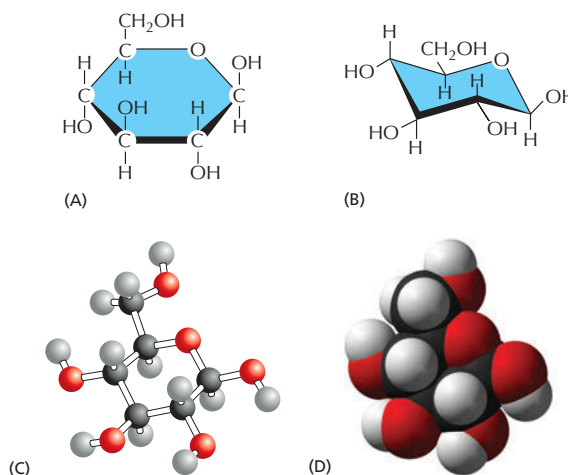
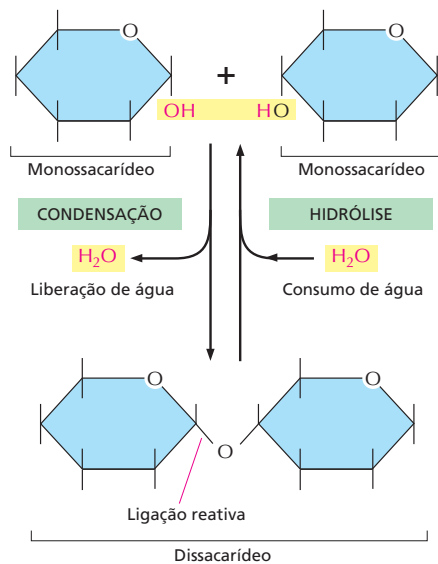



Figura 2-17 Dois monossacaríedos podem ser ligados para formar um dissacarídeo. Essa reação pertence a uma categoria geral de reações denominada *reações de condensação*, nas quais duas moléculas se unem como resultado da perda de uma molécula de água. A reação inversa (na qual há adição de água) é denominada *hidrólise*.

culas formadas por um número pequeno de monômeros, entre 3 e cerca de 50. Os polímeros, por outro lado, podem conter centenas ou milhares de subunidades.

A maneira pela qual os açúcares se ligam entre si formando polímeros ilustra algumas das características comuns na formação das ligações bioquímicas. Uma ligação é formada entre um grupo –OH de um açúcar e um grupo –OH de outro açúcar por uma **reação de condensação**, havendo a liberação de uma molécula de água quando a ligação é formada (**Figura 2-17**). Em outros polímeros biológicos, como os ácidos nucleicos e as proteínas, as subunidades também são ligadas por reações de condensação nas quais há liberação de água. As ligações criadas por todas essas reações de condensação podem ser rompidas por **hidrólise**, o processo inverso no qual há consumo de moléculas de água (ver Figura 2-17).

Uma vez que cada monossacarídeo tem vários grupos hidroxila livres que podem formar uma ligação com um outro monossacarídeo (ou com algum outro composto), os açúcares podem ser ramificados, e, consequentemente, o número de estruturas de polissacarídeos possíveis de existir é extremamente grande. Por conta disso, a tarefa de determinar o arranjo dos açúcares nos polissacarídeos é muito mais complexa do que determinar a sequência de nucleotídeos em uma molécula de DNA, em que cada unidade é ligada à seguinte exatamente da mesma maneira.

O monossacarídeo *glicose* tem um papel importante como fonte de energia para as células. Em uma série de reações, a glicose é degradada a moléculas menores liberando energia, que pode ser aproveitada pela célula para fazer algum trabalho útil, como está explicado no Capítulo 13. As células utilizam polissacarídeos simples, compostos apenas de unidades de glicose – principalmente *glicogênio* nos animais e *amido* nas plantas – como reservas de energia de longo prazo.

Os açúcares não funcionam somente na produção e no armazenamento de energia. Eles também são usados, por exemplo, para dar sustentação mecânica. O composto químico mais abundante na Terra, a *celulose,* que forma a parede das células vegetais, é um polissacarídeo de glicose. Uma outra substância orgânica extraordinariamente abundante, a *quitina* do exoesqueleto de insetos e da parede das células dos fungos, também é um polissacarídeo, nesse caso, um polímero linear de um derivado da glicose denominado *N*-acetilglicosamina (ver Painel 2-3, p. 68-69). Polissacarídeos de vários outros tipos, com a tendência de serem pegajosos quando úmidos, são os componentes principais da gosma, do muco e da cartilagem dos animais.

Os oligossacarídeos pequenos podem ser ligados a proteínas, formando *glicoproteínas*, e a lipídeos, formando *glicolipídeos* (**Painel 2-4**, p. 70-71), ambos encontrados nas membranas celulares. A superfície da maioria das células é revestida e adornada com polímeros de açúcares que pertencem a glicoproteínas

QUESTÃO 2-6

Dê uma olhada cuidadosa nas representações de preenchimento espacial da molécula de glicose mostradas nas Figuras 2-16D. Observe que em ambas as ilustrações existem átomos de hidrogênio de dois tamanhos diferentes. Devemos pedir desculpas porque o artista se enganou? Explique a resposta.

Figura 2-18 Os ácidos graxos têm componentes tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. A cadeia hidrocarbonada hidrofóbica está ligada a um grupo carboxílico hidrofílico. Aqui é mostrado o ácido palmítico. Ácidos graxos diferentes possuem caudas hidrocarbonadas diferentes. (A) Fórmula estrutural. O grupo ácido carboxílico da cabeça é mostrado na forma ionizada. (B) Modelo esfera-bastão. (C) Modelo de preenchimento espacial. (**Animação 2.2**)

Figura 2-19 As propriedades das gorduras dependem das cadeias laterais dos ácidos graxos que elas possuem. Os ácidos graxos são armazenados no citoplasma de muitas células na forma de gotículas de compostos de *triacilglicerol* formados por três cadeias de ácidos graxos ligadas a uma molécula de glicerol. (A) A gordura saturada, como o triestearato, é encontrada na carne e em produtos lácteos. A falta de ligações duplas nas cadeias dos ácidos graxos permite que essas moléculas se compactem muito firmemente. É por isso que a manteiga e a banha são sólidos a temperatura ambiente. (B) Os óleos vegetais, como o óleo de milho, contêm ácidos graxos insaturados, que podem ser monoinsaturados (contêm uma ligação dupla) ou poli-insaturados (contêm mais de uma ligação dupla). A ligação dupla produz uma dobra na cadeia de ácido graxo que impede a compactação firme da gordura. Em virtude disso, os óleos vegetais são líquidos a temperatura ambiente. Embora as gorduras sejam essenciais na dieta, gorduras saturadas aumentam a concentração de colesterol no sangue e provocam o entupimento das artérias por gordura, condição que pode levar a doenças do coração. Por essa razão, os fabricantes têm eliminado gorduras saturadas dos alimentos industrializados.

ou a glicolipídeos da membrana celular. As cadeias laterais desses açúcares geralmente são reconhecidas seletivamente por outras células. As diferenças entre os tipos de açúcares da superfície das células constitui a base molecular para as diferenças entre os distintos grupos sanguíneos humanos.

Os ácidos graxos são componentes das membranas celulares

Uma molécula de **ácido graxo**, como o *ácido palmítico* (**Figura 2-18**), tem duas regiões quimicamente distintas. Uma dessas regiões é formada por uma longa cadeia hidrocarbonada, que é hidrofóbica e não tem muita reatividade química. A outra região é um grupo carboxila (–COOH), que se comporta como um ácido (ácido carboxílico), pois ele se ioniza em solução ($-COO^-$), é extremamente hidrofílico e quimicamente reativo. A quase totalidade das moléculas de ácidos graxos das células está ligada covalentemente a outras moléculas pelos seus grupos ácido carboxílico (ver Painel 2-4, p. 70-71). Moléculas como as dos ácidos graxos, que possuem tanto regiões hidrofóbicas como hidrofílicas, são denominadas *anfipáticas.*

A cauda hidrocarbonada do ácido palmítico é *saturada:* não há ligações duplas entre os átomos de carbono, contendo, então, o número máximo de hidrogênios possível. O ácido esteárico, outro dos ácidos graxos comuns da gordura animal, também é saturado. Outros ácidos graxos, como o ácido oleico, possuem caudas *insaturadas* com uma ou mais ligações duplas ao longo da cadeia. Cada ligação dupla produz um dobramento na molécula, interferindo na capacidade que as moléculas têm de se agregarem em uma massa sólida. A presença ou ausência dessas ligações duplas é responsável pelas diferenças entre a gordura sólida (saturada) e a mole (poli-insaturada) da margarina. Ácidos graxos também são encontrados nas membranas celulares, e o quão firmemente estiverem compactados determina a fluidez da membrana. O grande número de ácidos graxos diferentes encontrados nas células varia entre si somente quanto ao comprimento das suas cadeias hidrocarbonadas e quanto ao número e à posição das ligações duplas carbono-carbono (ver Painel 2-4).

Nas células, os ácidos graxos funcionam como uma reserva concentrada de alimento porque sua degradação produz cerca de seis vezes mais energia utilizável do que a degradação da glicose (relação peso/peso). Eles são armazenados no citoplasma de muitas células na forma de gotículas de moléculas de *triacilgliceróis*, compostos formados por três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol (ver Painel 2-4). Essas moléculas constituem as gorduras animais encontradas na carne, na manteiga, no creme de leite e nos óleos vegetais como o óleo de milho e o azeite de oliva (**Figura 2-19**). Quando as células necessitam

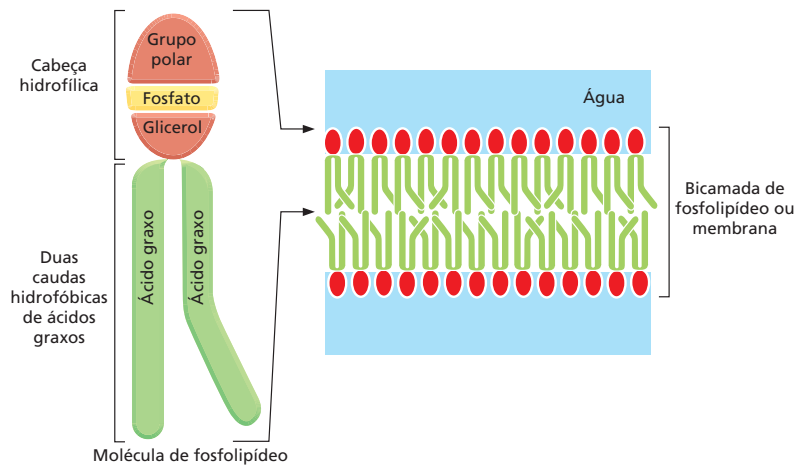



Figura 2-20 Os fosfolipídeos se agregam formando as membranas celulares. Os fosfolipídeos são compostos de duas caudas hidrofóbicas de ácidos graxos unidas a uma cabeça hidrofílica. Em um ambiente aquoso, as caudas hidrofóbicas dos fosfolipídeos se compactam entre si, expulsando a água e assim formando uma bicamada com a cabeça hidrofílica de cada fosfolipídeo voltada para o ambiente aquoso.

de energia, as cadeias de ácidos graxos podem ser liberadas dos triacilgliceróis e degradadas até unidades de dois carbonos. Essas unidades de dois carbonos são idênticas àquelas derivadas da degradação da glicose e entram na mesma sequência de reações que produz energia, como está descrito no Capítulo 13.

Os ácidos graxos e os seus derivados, como os triacilgliceróis, são exemplos de *lipídeos.* Essa classe de moléculas biológicas é definida, um tanto vagamente, como sendo o conjunto de moléculas biológicas que têm a característica comum de serem insolúveis em água e solúveis em gorduras e em solventes orgânicos, como o benzeno. Caracteristicamente, os lipídeos contêm ou uma longa cadeia hidrocarbonada, como nos ácidos graxos e nos *isoprenos,* ou então múltiplos anéis aromáticos, como nos *esteróis* (ver Painel 2-4, p. 70-71).

A função mais importante dos ácidos graxos em uma célula é participar da formação das membranas. Essas películas finas envolvem todas as células e também rodeiam as organelas internas. Elas são compostas principalmente de *fosfolipídeos,* que são moléculas pequenas que, como os triacilgliceróis, são constituídos principalmente de ácidos graxos e de glicerol. Nos fosfolipídeos, o glicerol está ligado a duas cadeias de ácidos graxos, em vez de três, como nos triacilgliceróis. O "terceiro" sítio do glicerol se une a um grupo fosfato que é hidrofílico, o qual, por sua vez, está ligado a um composto hidrofílico pequeno como a colina (ver Painel 2-4). Os fosfolipídeos são muito anfipáticos: cada molécula de fosfolipídeo tem uma cauda hidrofóbica composta de duas cadeias de ácido graxo e uma cabeça hidrofílica onde se localiza o fosfato. Isso lhes dá propriedades físicas e químicas diferentes daquelas dos triacilgliceróis, que são predominantemente hidrofóbicos. Outros lipídeos presentes na membrana celular contêm um ou mais açúcares no lugar do grupo fosfato. Vários desses *glicolipídeos* desempenham papéis importantes na sinalização intracelular, como será visto no Capítulo 16.

A capacidade de os fosfolipídeos formarem membranas deriva dessa natureza anfipática. Os fosfolipídeos se esparramam sobre a superfície da água formando uma monocamada de moléculas de fosfolipídeos com suas caudas hidrofóbicas expostas ao ar e suas cabeças hidrofílicas mantendo contato com a água. Duas dessas camadas, quando em água, podem combinar-se facilmente, cauda com cauda, formando um sanduíche de fosfolipídeos, ou melhor, uma *bicamada lipídica.* Essa bicamada constitui a base estrutural das membranas celulares (**Figura 2-20**; discutido também no Capítulo 11).

Os aminoácidos são as subunidades das proteínas

Os **aminoácidos** formam uma classe variada de moléculas, mas com uma propriedade comum que os define: todos os aminoácidos possuem um grupo ácido carboxílico e um grupo amino, ambos ligados a um mesmo átomo de carbono, denominado carbono α (**Figura 2-21**). A variabilidade química dos aminoácidos deriva das cadeias laterais ligadas ao carbono α. As células usam os aminoácidos

Figura 2-21 **A alanina é um dos aminoácidos mais simples.** (A) No interior das células, onde o pH é próximo de 7, os aminoácidos livres ficam nas suas formas ionizadas, mas, quando incorporados em uma cadeia polipeptídica, as cargas dos grupos amino e carboxila desaparecem. (B) Modelo esfera-bastão e (C) modelo de preenchimento espacial da alanina (*C, preto;* H, *branco;* O, *vermelho;* N, *azul).*

para formarem **proteínas**, que são polímeros de aminoácidos ligados cabeça com cauda, formando uma longa cadeia, que, então, é enovelada em uma estrutura tridimensional única a cada proteína.

A ligação covalente entre dois aminoácidos adjacentes na cadeia proteica é chamada de *ligação peptídica.* Uma cadeia de aminoácidos também é conhecida como polipeptídeo (**Figura 2-22**). As ligações peptídicas são formadas por reações de condensação que unem um aminoácido ao seguinte. Independentemente de quais sejam os aminoácidos que os formem, os polipetídeos sempre possuem um grupo amino (NH_2) em uma de suas extremidades (seu *N-terminal)* e um grupo carboxila (COOH) na outra extremidade (seu *C-terminal).* Isso dá às proteínas e aos polipeptídeos uma direção definida, uma polaridade estrutural (diferente da polaridade elétrica).

Normalmente, são encontrados 20 tipos de aminoácidos nas proteínas, cada um deles com uma cadeia diferente ligada ao átomo de carbono α (ver **Painel 2-5**, p. 72-73). Os mesmos 20 aminoácidos ocorrem repetidas vezes em todas as proteínas, sejam elas de bactérias, plantas ou animais. A maneira como esse conjunto específico de 20 aminoácidos foi escolhido pela natureza é um dos mistérios relacionados à evolução da vida. Não existe qualquer razão óbvia dos motivos pelos quais outros aminoácidos também não servissem igualmente para essa finalidade. Uma vez que a escolha foi feita, não pode haver mais mudanças tal a quantidade de química que evoluiu para explorar essas estruturas. A mudança dos tipos de aminoácidos usados pelas células exigiria que cada ser vivo reequipasse seu metabolismo inteiramente para estar à altura das dificuldades advindas dessas novas unidades de construção de moléculas.

À semelhança dos açúcares, todos os aminoácidos, com exceção da glicina, existem como isômeros ópticos nas formas D e L (ver Painel 2-5). Entretanto, apenas as formas L são encontradas nas proteínas, embora D-aminoácidos possam ocorrer como parte da parede de bactérias e em alguns antibióticos. A origem do uso de apenas L-aminoácidos na construção de proteínas é mais um dos mistérios da evolução.

QUESTÃO 2-7

O que você supõe para esclarecer que apenas L-aminoácidos e não uma mistura de formas L e D de cada aminoácido são usados para construir as proteínas?

Extremidade N-terminal da cadeia polipeptídica

N–H
Phe H–C–CH_2–(anel benzênico)
O=C
N–H
Ser H–C–CH_2–OH
O=C
N–H
Glu H–C–CH_2–CH_2–$C(=O)O^-$
O=C
N–H
Lys H–C–CH_2–CH_2–CH_2–CH_2–NH_3^+
O=C

Extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica

Figura 2-22 **As proteínas são mantidas por ligações peptídicas.** Os quatro resíduos de aminoácidos mostrados estão ligados por três ligações peptídicas, uma delas realçada em *amarelo*. Um dos aminoácidos está sombreado em *cinza*. As cadeias laterais dos aminoácidos são mostradas em *vermelho*. As duas extremidades da cadeia polipetídica são quimicamente distintas. Uma extremidade, o N-terminal, termina com um grupo amino, e a outra, C-terminal, termina com um grupo carboxila. Nas proteínas, a sequência de resíduos de aminoácidos é abreviada usando-se tanto um código de três letras quanto um de uma letra. A sequência é sempre lida a partir da extremidade N-terminal (ver Painel 2-5, p. 74-73). Nesse exemplo, a sequência é Phe-Ser-Glu-Lys (ou FSEK).

A versatilidade química que os 20 aminoácidos-padrão possibilitam é de importância vital para a função das proteínas. Cinco dos 20 aminoácidos possuem cadeias laterais que, quando em solução, podem formar íons e assim podem carregar uma carga (a lisina e o ácido glutâmico, por exemplo, mostrados na Figura 2-22). Os demais são não carregados. Alguns são polares e hidrofílicos, e outros são não polares e hidrofóbicos (ver Painel 2-5). Como será discutido no Capítulo 4, as propriedades do conjunto das cadeias laterais dos aminoácidos constitui a base da diversidade e da sofisticação das funções das proteínas.

Os nucleotídeos são as subunidades do DNA e do RNA

Um *nucleosídeo* é uma molécula formada por um anel que contém um nitrogênio ligado a um açúcar de cinco carbonos. Esse açúcar pode ser tanto a ribose quanto a desoxirribose (**Painel 2-6**, p. 74-75). Os nucleosídeos que carregam um ou mais grupos fosfato ligados ao açúcar são denominados **nucleotídeos**. Os nucleotídeos que possuem ribose são conhecidos como *ribonucleotídeos*, e os que possuem desoxirribose são denominados *desoxirribonucleotídeos*.

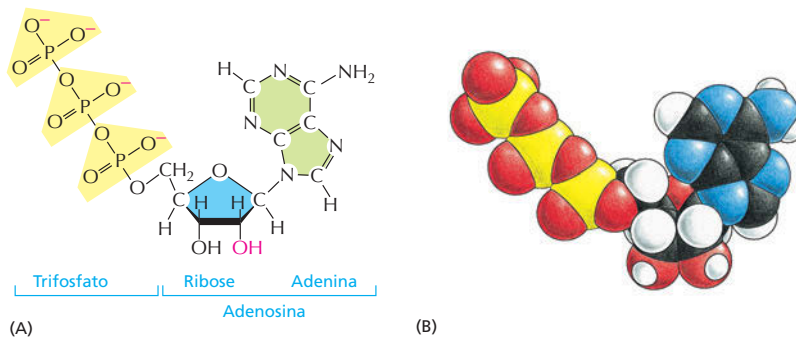



Figura 2-23 O trifosfato de adenosina (ATP) é um nucleotídeo cuja reatividade está nos seus grupos fosfato terminais. (A) Fórmula estrutural. Os três fosfatos são mostrados em *amarelo*. (B) Modelo de preenchimento espacial (**Animação 2.3**). Em (B), as cores dos átomos são C em *preto;* H em *branco;* N em *azul;* O em *vermelho* e P em *verde*. A versão desoxirribonucleotídeo do trifosfato de adenosina (dATP) difere apenas no fato de que um átomo de hidrogênio substitui o grupo hidroxila (*vermelho*) em A.

Os anéis contendo o átomo de nitrogênio são genericamente denominados *bases* em virtude de razões históricas: em condições ácidas, cada um deles pode ligar um H^+ (próton) e assim aumentar a concentração de íons OH^-, quando em solução aquosa. As diferentes bases têm uma grande semelhança entre si. *Citosina (C), timina* (T) e *uracila* (U) são denominadas *pirimidinas* porque elas são derivadas do anel da pirimidina, que tem seis átomos. A *guanina* (G) e a *adenina* (A) são *compostos* das *purinas* e possuem um segundo anel de cinco membros ligado ao anel de seis átomos. A denominação de cada um dos nucleotídeos está de acordo com a base que eles contêm (ver Painel 2-6, p. 74-75).

Os nucleotídeos podem atuar como carreadores de energia de curto prazo. Mais do que qualquer outro carreador de energia, o nucleotídeo **trifosfato de adenosina**, ou **ATP** (**Figura 2-23**), é usado para transferir energia em centenas de reações celulares. O ATP é formado por reações impelidas pela energia que é liberada pela degradação oxidativa dos alimentos. Seus três fosfatos estão ligados em série por meio de duas *ligações anidridofosfóricas* (ver Painel 2-6), que, ao serem rompidas, liberam grandes quantidades de energia útil. O grupo fosfato terminal é geralmente liberado por hidrólise (**Figura 2-24**). Em muitas situações, a transferência desse fosfato para outras moléculas libera energia para as reações biossintéticas que necessitam de energia. Outros derivados de nucleotídeos servem de carreadores para a transferência de certos grupos químicos, como está descrito no Capítulo 3.

O mais fundamental dos papéis dos nucleotídeos nas células é o armazenamento e a disponibilização da informação biológica. Os nucleotídeos servem como blocos ou unidades para a construção dos *ácidos nucleicos,* que são polímeros

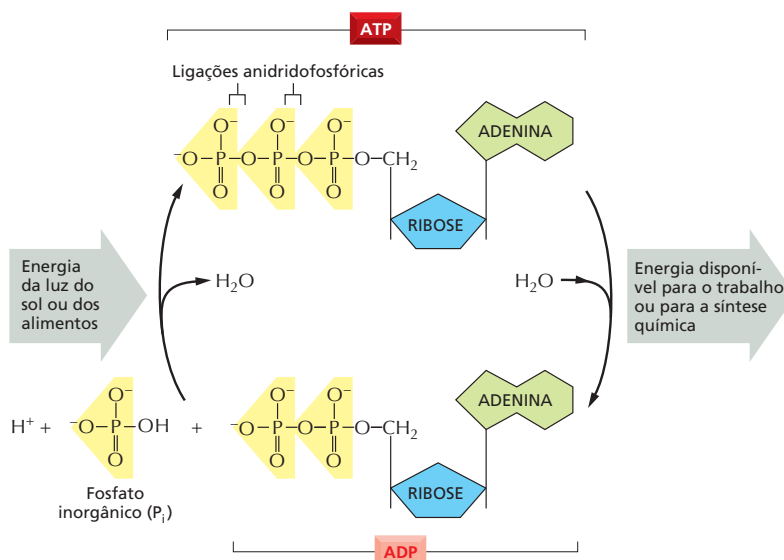



Figura 2-24 A molécula de ATP funciona como um carreador de energia nas células. A formação de ATP a partir de ADP e de fosfato inorgânico requer energia e é acoplada à oxidação dos alimentos, que libera energia (nas células animais, nos fungos e em algumas bactérias), ou acoplada à captura da energia da luz (nas plantas e em algumas bactérias). Por sua vez, a hidrólise do ATP novamente à ADP e fosfato inorgânico fornece a energia necessária para impelir muitas reações celulares. Em conjunto, essas reações formam o ciclo do ATP.

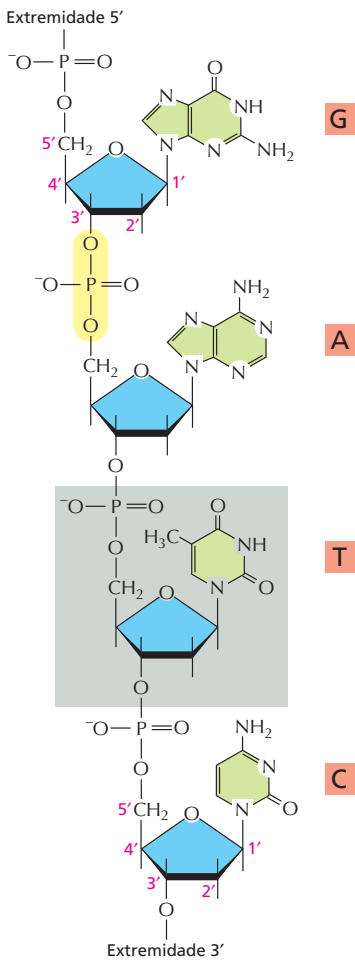



Figura 2-25 Pequeno segmento da cadeia de uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) mostrando as ligações entre quatro nucleotídeos consecutivos. Os nucleotídeos são unidos por ligações fosfodiéster entre átomos específicos do anel de açúcar, conhecidos como átomos 5′e 3′. Por essa razão, uma das extremidades da cadeia polinucleotídica, a extremidade 5′, tem um grupo fosfato livre, e a outra extremidade, a extremidade 3′, um grupo hidroxila livre. Um dos nucleotídeos é ressaltado por um quadro *cinza*. Uma das ligações fosfodiéster formadas pelo grupo fosfato de um nucleotídeo e o nucleotídeo adjacente é ressaltada em *amarelo*. A sequência linear de nucleotídeos da cadeia polinucleotídica geralmente é abreviada por um código de uma letra, e a sequência é sempre lida a partir da extremidade 5′. No exemplo dessa ilustração, a sequência é G-A-T-C.

longos nos quais as subunidades nucleotídicas são ligadas covalentemente pela formação de *ligações fosfodiéster* entre o grupo fosfato ligado ao açúcar de um nucleotídeo e o grupo hidroxila do açúcar do nucleotídeo seguinte (Figura 2-25). As cadeias de ácidos nucleicos são sintetizadas a partir de nucleotídeos trifosfatos (que são ricos em energia) por uma reação de condensação que libera pirofosfato inorgânico durante a formação da ligação fosfodiéster (ver Painel 2-6, p. 74-75).

Existem dois tipos principais de ácidos nucleicos, que se diferenciam quanto ao tipo de açúcar presente nos seus respectivos esqueletos acúcar-fosfato. Os nucleotídeos com base no açúcar ribose são conhecidos como **ácidos ribonucleicos**, ou **RNA**, e contêm as bases A, G, C e U. Aqueles com base na desoxirribose (onde a hidroxila da posição 2′ no anel de carbonos da ribose é substituída por um hidrogênio; ver Painel 2-6) são conhecidos como **ácidos desoxirribonucleicos**, ou **DNA**, e contêm as bases A, G, C e T (T é quimicamente semelhante a U do RNA (ver Figura 2-25). Geralmente o RNA está presente nas células na forma de cadeias individuais de polinucleotídeos, e o DNA aparece quase sempre na forma de uma molécula de fita dupla. A dupla-hélice do DNA é formada por duas cadeias polinucleotídicas posicionadas de forma antiparalela, uma em relação à outra. Elas são mantidas unidas por ligações de hidrogênio que se formam entre as bases das duas cadeias (ver Painel 2-7, p. 76-77).

A sequência linear dos nucleotídeos no DNA e no RNA codifica a informação genética. Os dois ácidos nucleicos, entretanto, possuem papéis diferentes nas células. O DNA, que é mais estável, com suas hélices mantidas por ligações de hidrogênio, funciona como depositário da informação hereditária a longo prazo, e o RNA de fita simples geralmente é um carreador transiente de instruções moleculares. A capacidade que as bases das moléculas dos diferentes ácidos nucleicos têm em se reconhecerem e se parearem umas às outras por meio de ligações de hidrogênio (denominada *pareamento de bases*) – G com C, e A tanto com T quanto com U – constitui-se no fundamento de toda a evolução, como é explicado no Capítulo 5.

AS MACROMOLÉCULAS NAS CÉLULAS

Com base no peso, as macromoléculas são de longe as moléculas que contêm carbono mais abundantes nas células (Figura 2-26). Elas constituem as principais unidades de construção das células e também são os componentes que conferem as principais características específicas dos seres vivos. Intermediárias em tamanho e complexidade entre as moléculas pequenas e as organelas celulares, as **macromoléculas** são polímeros construídos simplesmente pela ligação covalente entre moléculas orgânicas pequenas (chamadas de **monômeros**, ou *subunidades)* formando longas cadeias ou **polímeros** (ver Figura 2-27 e Como Sabemos, p. 60-61). As macromoléculas apresentam muitas propriedades inesperadas que não podem ser preditas com base nas unidades que as formam. Por exemplo, as moléculas de DNA e RNA (os ácidos nucleicos) armazenam e transmitem a informação hereditária.

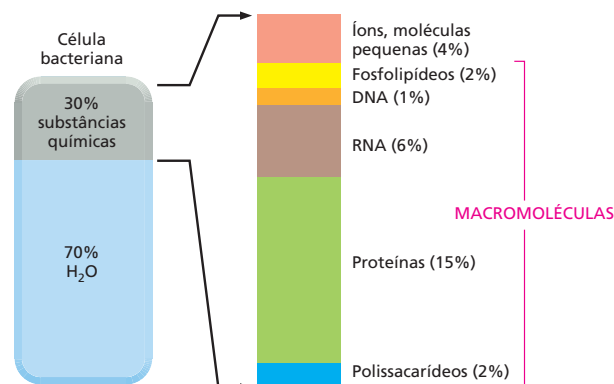
Figura 2-26 As macromoléculas são abundantes nas células. A composição aproximada de uma célula bacteriana é mostrada. A composição das células animais é semelhante.

As proteínas são especialmente abundantes e versáteis. Elas executam milhares de funções diferentes nas células. Muitas proteínas funcionam como enzimas que catalisam as reações químicas que ocorrem nas células, incluindo todas as reações pelas quais as células obtêm energia das moléculas de alimentos. As enzimas também catalisam a síntese de muitas moléculas importantes. Por exemplo, a enzima denominada ribulose bifosfato carboxilase, encontrada nos cloroplastos, converte, nas plantas, o CO_2 em açúcares. Assim, essa proteína produz a maior parte da matéria orgânica usada pelo resto do mundo vivo. Outras proteínas são utilizadas para construir componentes estruturais, como a tubulina, uma proteína que se auto-organiza para formar os longos e rígidos microtúbulos das células (ver Figura 1-27B). As histonas são proteínas que compactam o DNA nos cromossomos. Outras proteínas atuam como motores moleculares que produzem força e movimento, como é o caso da miosina nos músculos. As proteínas podem ainda ter uma ampla variedade de outras funções. Posteriormente, as bases moleculares de muitas dessas funções serão examinadas. Aqui, são discutidos apenas alguns dos princípios gerais da química das macromoléculas que fazem com que essas funções sejam possíveis.

Figura 2-27 Os polissacarídeos, as proteínas e os ácidos nucleicos são formados a partir de subunidades monoméricas. Cada macromolécula é um polímero formado a partir de moléculas pequenas (denominadas monômeros ou subunidades) unidas entre si por ligações covalentes.

As macromoléculas contêm sequências específicas de subunidades

Embora as reações químicas que adicionam subunidades a cada polímero (proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos) tenham detalhes diferentes, elas compartilham características comuns importantes. O crescimento dos polímeros ocorre pela adição de um monômero à extremidade da cadeia polimérica que está crescendo por meio de uma reação de condensação, na qual uma molécula de água é perdida cada vez que uma subunidade é adicionada (**Figura 2-28**; ver também Figura 2-17). Em todos os casos, as reações são catalisadas por enzimas específicas que asseguram a incorporação apenas de monômeros do tipo apropriado.

A polimerização pela adição dos monômeros, um a um, para formar cadeias longas é a mais simples das maneiras de fazer uma molécula grande e complexa, pois as subunidades são adicionadas por uma mesma reação que é executada repetidamente muitas e muitas vezes pelo mesmo conjunto de enzimas. Em certo sentido, o processo se assemelha às operações repetitivas das máquinas em uma fábrica, mas com diferenças importantes. Primeiro, excluindo certos polissacarídeos, a maioria das macromoléculas são feitas de um conjunto de monômeros que são ligeiramente diferentes um do outro. Por exemplo, os 20 aminoácidos diferentes que participam da construção das proteínas (ver Painel 2-5, p. 72-73). Segundo, e mais importante ainda, as cadeias de polímeros não são feitas pela montagem das subunidades aleatoriamente. Em vez disso, as subunidades são adicionadas segundo uma ordem bem-definida, ou **sequência**.

Os mecanismos que especificam a sequência dos polímeros celulares são discutidos nos Capítulos 6 e 7. Esses mecanismos são centrais para a biologia porque as funções biológicas das proteínas, dos ácidos nucleicos e de muitos polissacarídeos dependem de maneira absoluta da sequência específica das subunidades na cadeia linear. Assim, para uma cadeia proteica de 200 aminoácidos, existem 20^{200} combinações possíveis ($20 \times 20 \times 20 \times 20$..., multiplicando 200 vezes), ao passo que, para uma molécula de DNA com um comprimento de 10.000 nucleotídeos (pequena para os padrões de DNA), com os seus quatro diferentes nucleotídeos, existem $4^{10.000}$ possibilidades diferentes, um número inimaginavelmente grande. Assim, a maquinaria de polimerização deve estar submetida a um controle muito sensível que lhe permita especificar exatamente quais as subunidades que devem ser adicionadas na etapa seguinte do crescimento do polímero.

Figura 2-28 As macromoléculas são formadas pela adição de subunidades a uma das extremidades. Nas reações de condensação, uma molécula de água é perdida a cada adição de monômero a uma das extremidades da cadeia crescente. A reação inversa, a quebra do polímero, ocorre pela simples adição de água (hidrólise).

As ligações não covalentes determinam a forma precisa das macromoléculas

A maior parte das ligações covalentes das macromoléculas permite a rotação dos átomos que participam da ligação, consequentemente, as cadeias de polímeros

COMO SABEMOS:
O QUE SÃO AS MACROMOLÉCULAS?

A ideia de que as proteínas, os polissacarídeos e os ácidos nucleicos são moléculas grandes e formadas a partir de subunidades menores, ligadas entre si em longas cadeias moleculares, pode parecer muito óbvia nos dias de hoje. Entretanto, não foi sempre assim. No início do século XX, poucos eram os cientistas que acreditavam na existência de tais macromoléculas – polímeros formados por unidades repetitivas mantidas unidas por ligações covalentes. A ideia de que compostos tão "espantosamente grandes" pudessem ser formados a partir de blocos de construção simples era considerada completamente "escandalosa" pelos químicos da época. Ao contrário, eles pensavam que as proteínas e outras moléculas igualmente grandes seriam simplesmente agregados heterogêneos de moléculas pequenas unidas por "forças de associação fracas" (**Figura 2-29**).

A primeira sugestão de que as proteínas e outros polímeros fossem tão grandes veio da observação do seus comportamentos em solução. Naquela época, os cientistas estavam trabalhando com uma variedade de proteínas e hidratos de carbono provenientes de alimentos e materiais naturais – albumina da clara do ovo, caseína do leite, colágeno da gelatina e celulose da madeira. As composições químicas pareciam muito simples, semelhantes à de outras moléculas orgânicas: elas continham carbono, hidrogênio, oxigênio e, no caso das proteínas, nitrogênio. Contudo, elas tinham um comportamento estranho em solução, apresentando, por exemplo, uma incapacidade de se difundirem através de um filtro fino.

Explicar o motivo do comportamento inesperado dessas moléculas em solução era um quebra-cabeça. Seriam elas realmente moléculas gigantes formadas por um número incomumente grande de átomos ligados por ligações covalentes? Seriam mais como uma suspensão coloidal de partículas, uma miscelânea pegajosa de moléculas mais simples associadas frouxamente?

Figura 2-29 Como pode ser a aparência de uma macromolécula? No início do século XX, os químicos debateram se as proteínas, os polissacarídeos e outras moléculas aparentemente grandes seriam (A) partículas discretas feitas de um número incomumente grande de átomos ligados covalentemente, ou seriam (B) um agregado frouxo e heterogêneo de pequenas moléculas mantidas unidas por meio de forças de associação fracas.

Uma maneira de distinguir entre as duas possibilidades seria determinar o tamanho verdadeiro dessas moléculas. Se uma substância como a albumina sérica fosse feita de moléculas com tamanhos iguais, isso daria suporte à ideia da existência de macromoléculas. Se, ao contrário, a albumina fosse uma miscelânea de peptídeos aglomerados, uma solução de albumina deveria ter moléculas de vários tamanhos.

Infelizmente, nos primeiros anos do século XX, as técnicas que os cientistas tinham disponíveis não eram ideais para medir o tamanho de moléculas tão grandes. Alguns químicos estimavam o tamanho das proteínas determinando o quanto elas diminuíam o ponto de congelamento de uma solução. Outros mediam a pressão osmótica de soluções de proteínas. Esses métodos eram suscetíveis a erros experimentais e davam resultados variados. Diferentes técnicas, por exemplo, sugeriam que a celulose tinha uma massa entre 6.000 e 103.000 dáltons (1 dálton é aproximadamente igual à massa de um átomo de hidrogênio). Essas variações ajudavam a reforçar a hipótese de que as proteínas e os hidratos de carbono fossem agregados frouxos, e não macromoléculas.

Muitos cientistas tinham dificuldade em aceitar que moléculas com mais de 4.000 dáltons – o tamanho do maior composto que tinha sido sintetizado pela química orgânica – pudessem existir. Tomemos o caso da hemoglobina, a proteína carreadora de oxigênio das hemácias. Os pesquisadores tentavam estimar o seu tamanho quebrando-a em seus componentes químicos. Além de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, a hemoglobina possui uma pequena quantidade de ferro. Trabalhando com porcentagens, parecia que a hemoglobina tinha um átomo de ferro para cada 712 átomos de carbono, portanto, um mínimo de 16.700 dáltons. Uma molécula com centenas de átomos de carbono em cadeia poderia permanecer intacta em uma célula e desempenhar funções específicas? Emil Fischer, o químico orgânico que determinou que os aminoácidos, nas proteínas, são ligados por ligações peptídicas, pensava que uma cadeia polipeptídica não pudesse crescer mais do que 30 ou 40 aminoácidos. No caso da hemoglobina, a cadeia teria 700 átomos de carbono. A existência de moléculas com cadeias com "comprimentos verdadeiramente fantásticos" era considerada pelos químicos proeminentes da época como "muito improvável".

O final do debate teve de esperar pelo desenvolvimento de novas técnicas. Evidências convincentes de que as proteínas são macromoléculas vieram de estudos realizados com o uso de ultracentrífuga – aparelho que utiliza a força centrífuga para separar moléculas de acordo com os seus tamanhos (**Figura 2-30**; ver também Painel 4-4, p. 164-165). Theodor Svedberg foi quem desenhou o equipamento em 1925 e realizou os primeiros estudos. Se uma proteína realmente fosse um agregado de moléculas pequenas – ele raciocinou –, ela deveria

Figura 2-30 A ultracentrífuga ajudou a resolver o debate sobre as macromoléculas. Em uma ultracentrífuga, forças centrífugas que ultrapassam a força da gravidade em mais de 500.000 vezes podem ser usadas para separar proteínas e outras moléculas grandes. (A) Em uma ultracentrífuga moderna, as amostras são depositadas em uma pequena camada no topo de um gradiente de sacarose formado em um tubo. O tubo é colocado em um rotor de metal que gira em alta velocidade na ultracentrífuga. Moléculas de diferentes tamanhos sedimentam em velocidades diferentes. Assim, essas moléculas se moverão como bandas distintas no tubo. Se a hemoglobina fosse um agregado frouxo de peptídeos heterogêneos, depois da centrifugação, ela mostraria uma mancha larga de muitos tamanhos *(no topo)*. Em vez disso, ela aparece como uma banda bem definida com um peso molecular de 68.000 dáltons *(embaixo)*. Embora a ultracentrífuga atualmente seja um equipamento comum, quase que mundano, na maioria dos laboratórios de bioquímica, sua construção foi um desafio tecnológico enorme. O rotor da centrífuga deve ser capaz de girar a altas rotações por horas a fio sob temperatura constante e com alta estabilidade, pois, de outro modo, ocorreria convecção na solução sob sedimentação, o que inutilizaria o experimento. Em 1926, Svedberg ganhou o Prêmio Nobel de Química por seu projeto de ultracentrífuga e de suas aplicações na química. (B) No experimento que fez, Svedberg encheu um tubo especial de uma ultracentrífuga com uma solução homogênea de hemoglobina. Pela iluminação através do tubo, ele podia monitorar cuidadosamente a fronteira móvel entre as moléculas de proteínas sob sedimentação e a solução aquosa límpida deixada para trás (a denominada fronteira de sedimentação). O método desenvolvido mais recentemente mostrado em (A) é uma forma de "banda de sedimentação".

aparecer como um rastro de moléculas de diferentes tamanhos quando sedimentada em uma ultracentrífuga. Usando a hemoglobina como sua proteína-teste, Svedberg verificou que a amostra centrifugada aparecia como uma única banda bem definida e com um peso molecular de 68.000. Os seus resultados deram forte suporte para a teoria de que as proteínas fossem verdadeiras macromoléculas.

Evidências adicionais continuaram a se acumular durante a década de 1930 à medida que outros cientistas começaram a preparar cristais de proteínas puras que puderam ser estudados por difração de raios X. Apenas moléculas com tamanhos e formas uniformes podem formar cristais altamente ordenados e difratar raios X de modo tal que suas estruturas tridimensionais possam ser determinadas, como será visto no Capítulo 4. Uma suspensão heterogênea não pode ser estudada dessa maneira.

Hoje em dia, tem-se como certo que moléculas grandes desempenhem muitas das mais importantes funções das células vivas. Entretanto, químicos respeitáveis antigamente encaravam a existência desses polímeros com o mesmo tipo de ceticismo que um zoólogo demonstraria se fosse informado de que, em algum lugar da África, vivem elefantes com 100 metros de comprimento e 20 metros de altura. Passaram-se décadas até que os cientistas dominassem as técnicas que fizeram com que todos se convencessem de que moléculas 10 vezes maiores do que qualquer outra que eles tinham encontrado até então fossem um dos alicerces da biologia. Como visto neste livro, um caminho tão trabalhoso de descobertas não é incomum, e o progresso das ciências geralmente depende de avanços nas tecnologias.

Figura 2-31 **A maioria das moléculas de proteína e muitas moléculas de RNA se enovelam em apenas uma forma tridimensional particularmente estável, ou conformação.** Se as ligações fracas que mantêm essa conformação estável são rompidas, a molécula passa a ser uma cadeia flexível que perde sua atividade biológica.

possuem enorme flexibilidade. Em princípio, isso possibilita que as macromoléculas adotem um número praticamente ilimitado de formas, ou **conformações**, à medida que o polímero oscila e gira em razão da energia cinética (que é aleatória). Entretanto, as formas da maior parte das macromoléculas são altamente condicionadas pelas muitas **ligações não covalentes** fracas formadas entre as diferentes partes da própria molécula. Caso essas ligações não covalentes sejam formadas em número suficiente, a cadeia do polímero se enovela firmemente em uma conformação preferencial que é determinada pela sequência linear dos monômeros na cadeia (**Figura 2-31**). Essas conformações únicas, lapidadas pela seleção natural, determinam a química e a atividade dessas macromoléculas e determinam como elas interagem com outras moléculas biológicas.

As ligações não covalentes importantes para as moléculas biológicas incluem dois tipos discutidos anteriormente neste capítulo – as atrações eletrostáticas e as ligações de hidrogênio (Painel 2-7, p. 76-77). As atrações eletrostáticas, embora fortes por si mesmas, são muito fracas em soluções aquosas. Isso porque os grupos carregados, ou parcialmente carregados (polares), são encobertos por interações com moléculas de água ou com outros sais presentes na solução aquosa. Atrações eletrostáticas, entretanto, são muito importantes nos sistemas biológicos. Uma enzima que ligue um substrato de carga positiva geralmente usa uma cadeia lateral de aminoácido negativa para guiar o substrato para a posição apropriada. Além disso, a importância da ligação de hidrogênio no estabelecimento das propriedades singulares da água foi mencionada. Ligações de hidrogênio também mantêm as duas fitas da dupla-hélice de DNA unidas. Uma vez que individualmente as ligações de hidrogênio são fracas, as enzimas podem facilmente abrir a hélice quando, por exemplo, a célula necessita copiar seu material genético.

Um terceiro tipo de ligação fraca resulta das *atrações de van der Waals,* que são uma forma de atração elétrica causada pela flutuação das cargas elétricas que aparecem quando dois átomos se aproximam a distâncias muito curtas. Embora as interações de van der Waals sejam mais fracas do que as ligações de hidrogênio, quando em grande número, elas têm um papel importante na atração entre moléculas grandes que tenham formas complementares. Todas essas forças não covalentes são revisadas no Painel 2-7.

Uma outra força não covalente importante é criada pela estrutura tridimensional da água, que força os grupos hidrofóbicos entre si de modo a minimizar o efeito que eles têm em perturbar as ligações de hidrogênio que mantêm a rede de moléculas de água (ver Painel 2-7 e Painel 2-2, p. 66-67). Essa expulsão da solução aquosa gera o que é algumas vezes conhecido como um quarto tipo de ligação não covalente fraca, denominado *interação hidrofóbica.* Essa interação força as moléculas de fosfolipídeos a se unirem entre si nas membranas celulares e também dá, para a maioria das moléculas de proteína, uma forma globular compacta.

QUESTÃO 2-9

Em princípio, existem muitas maneiras diferentes, quimicamente diversas, pelas quais moléculas pequenas podem ser ligadas para formar polímeros. Por exemplo, a pequena molécula de eteno (CH_2=CH_2) é usada comercialmente para fazer o plástico polietileno (... –CH_2– CH_2– CH_2– CH_2– CH_2–...). As subunidades de cada uma das três classes de macromoléculas biológicas, entretanto, são ligadas por reações com mecanismos similares, isto é, por reações de condensação que eliminam água. O que você pensa dos benefícios que, porventura, essa química oferece e por que ela foi selecionada na evolução?

Figura 2-32 Ligações não covalentes são mediadoras nas interações entre macromoléculas.

As ligações não covalentes permitem que as macromoléculas se liguem a outras moléculas selecionadas

Embora individualmente as ligações não covalentes sejam muito fracas, elas podem somar-se e criar uma atração forte entre duas moléculas, quando essas moléculas se encaixarem perfeitamente uma à outra (como mão em uma luva) com muitas ligações não covalentes entre elas (ver Painel 2-7, p. 76-77). Essa forma de interação molecular é responsável pela grande especificidade das ligações entre macromoléculas e outras moléculas (pequenas ou grandes), isso porque os contatos de muitos pontos necessários para que haja uma ligação forte fazem com que uma macromolécula possa selecionar, por meio de ligações interativas, apenas uma dos vários milhares de moléculas presentes em uma célula. Mais ainda, em razão da dependência que a intensidade de ligação tem pelo número de ligações não covalentes que são formadas, é possível que se formem interações de praticamente qualquer intensidade.

Ligações desse tipo são a base de todas as catálises biológicas e possibilitam que as proteínas funcionem como enzimas. Ligações não covalentes também podem estabilizar associações entre duas macromoléculas diferentes, caso suas superfícies se encaixem perfeitamente (**Figura 2-32** e **Animação 2.4**). Em virtude disso, essas ligações permitem que as macromoléculas sejam usadas como elementos de construção na formação de estruturas muito maiores. Por exemplo, as proteínas geralmente se ligam entre si em complexos multiproteicos, formando, assim, máquinas intrincadas com muitas partes móveis que realizam tarefas complexas como a replicação do DNA e a síntese de proteínas (**Figura 2-33**). Essas ligações não covalentes são responsáveis por muito da especificidade associada às células vivas.

QUESTÃO 2-10

Por que ligações covalentes não podem ser usadas no lugar de ligações não covalentes para intermediar a maioria das interações das macromoléculas?

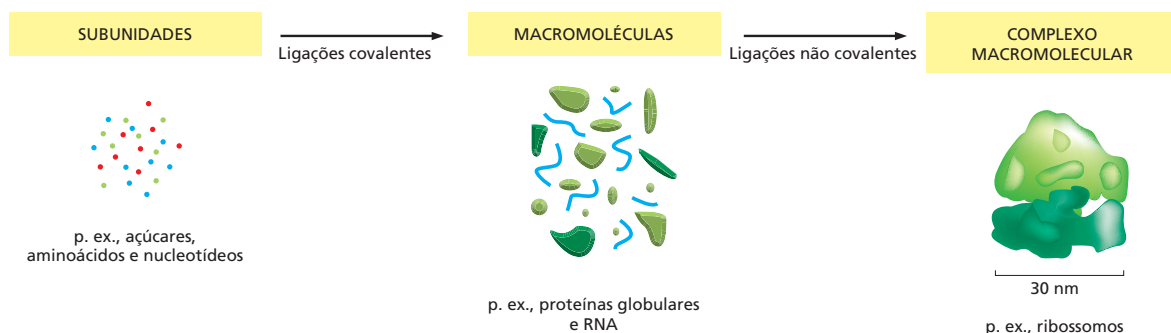
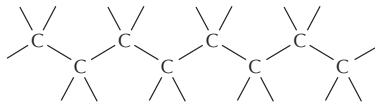
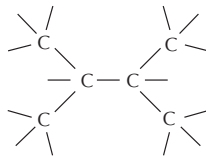



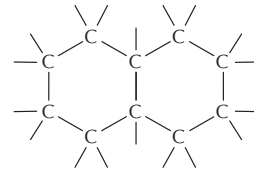
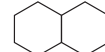
Figura 2-33 **Moléculas pequenas se juntam para formar macromoléculas, as quais podem organizar-se em grandes complexos macromoleculares.** As subunidades, as proteínas e o ribossomo estão desenhados em escala. Os ribossomos são a parte da maquinaria que as células usam para fazer as proteínas. Cada ribossomo é composto por cerca de 90 macromoléculas (moléculas de proteína e de RNA) e é grande o suficiente para ser visto em um microscópio eletrônico (ver Figura 7-30).

PAINEL 2-1 Ligações e grupos químicos

ESQUELETOS DE CARBONOS

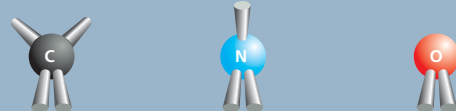
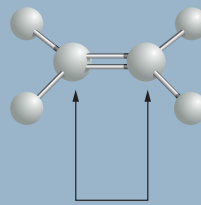
O carbono tem um papel único nas células em razão da sua capacidade em formar ligações covalentes fortes com outros átomos de carbono. Assim, os átomos de carbono podem juntar-se para formar cadeias

Também representado como

ou árvores ramificadas

Também representado como

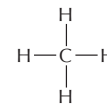
ou anéis.

Também representado como

LIGAÇÕES COVALENTES

Há formação de uma ligação covalente quando dois átomos ficam muito próximos um do outro e compartilham um ou mais elétrons. Cada átomo forma um número fixo de ligações covalentes com um arranjo espacial definido.

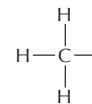
LIGAÇÃO SIMPLES: 2 elétrons são compartilhados por ligação

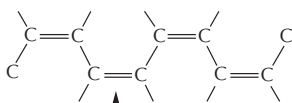
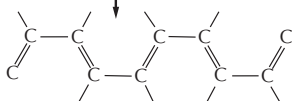
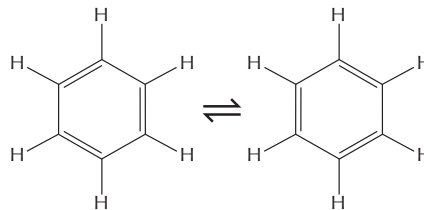
LIGAÇÃO DUPLA: 4 elétrons são compartilhados por ligação

O arranjo espacial preciso das ligações covalentes influencia a estrutura tridimensional e a química das moléculas. Neste painel de revisão, observa-se como as ligações covalentes são usadas em várias moléculas biológicas.

Os átomos ligados por duas ou mais ligações covalentes não podem girar livremente ao redor do eixo da ligação. Essa restrição tem grande influência na forma tridimensional de muitas macromoléculas.

COMPOSTOS C–H

O carbono e o hidrogênio se combinam entre si para formarem compostos estáveis (ou grupos) denominados hidrocarbonetos. Eles são não polares, não formam ligações de hidrogênio e geralmente são insolúveis em água.

Metano

Grupo metila

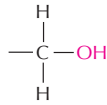
Parte da "cauda" de hidrocarboneto de uma molécula de ácido graxo

LIGAÇÕES DUPLAS ALTERNADAS

As cadeias de carbono podem incluir ligações duplas. Caso essas ligações estejam em átomos de carbono alternados, os elétrons das ligações se movem pela molécula e estabilizam a estrutura, fenômeno denominado ressonância.

A situação real é algo intermediário entre essas duas estrutura

A alternância de ligações duplas em um anel pode gerar estruturas muito estáveis.

Benzeno

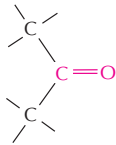
Frequentemente representado como

COMPOSTOS C–O

Muitos compostos biológicos contêm um carbono ligado a um oxigênio. Por exemplo,

Álcool

O grupo –OH é chamado de grupo hidroxila.

Aldeído

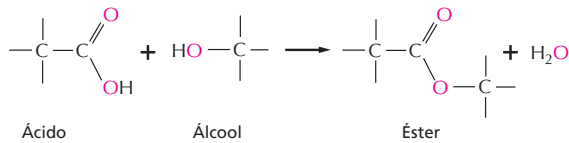
Cetona

O grupo C=O é chamado de grupo carbonila.

Ácido carboxílico

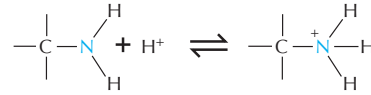
O grupo –COOH é chamado de grupo carboxila. Quando em água, ele perde um íon H^+ passando a $-COO^-$.

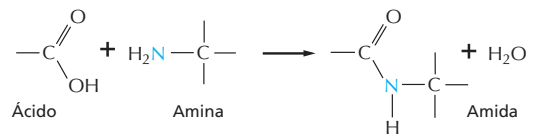
Ésteres

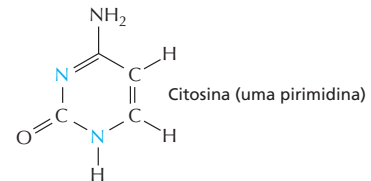
Os ésteres são formados pela combinação de um ácido e de um álcool.

Ácido + Álcool → Éster + H_2O

COMPOSTOS C–N

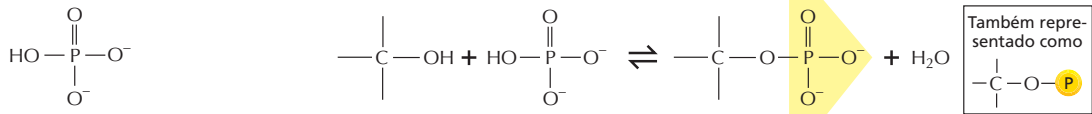
As aminas e amidas são dois exemplos importantes de compostos contendo um carbono ligado a um nitrogênio.

As aminas na água se combinam com um íon H^+ para se tornarem positivamente carregadas.

As amidas são formadas combinando um ácido e uma amina. Ao contrário das aminas, as amidas não têm carga na água. Um exemplo é a ligação peptídica que une os aminoácidos em uma proteína.

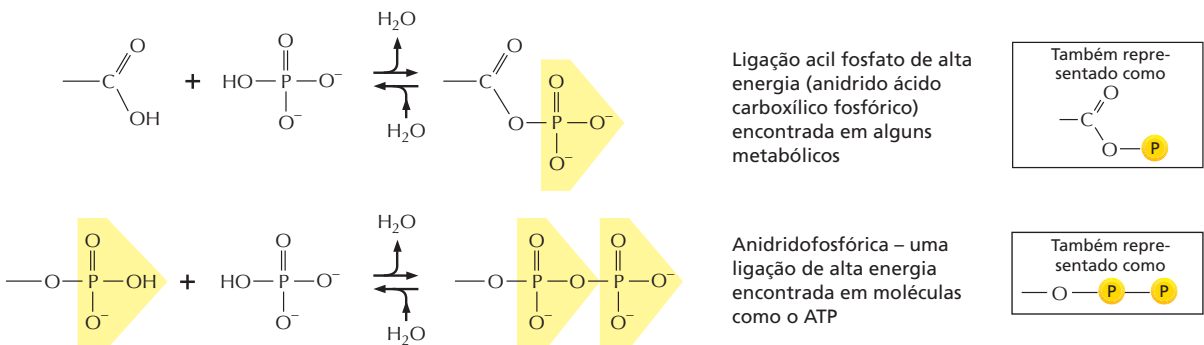
Ácido + Amina → Amida + H_2O

O nitrogênio também ocorre em diversos compostos cíclicos, incluindo constituintes importantes dos ácidos nucleicos: as purinas e as pirimidinas.

Citosina (uma pirimidina)

FOSFATOS

Fosfato inorgânico é um íon estável formado a partir do ácido fosfórico, H_3PO_4. Frequentemente ele é escrito como P_i.

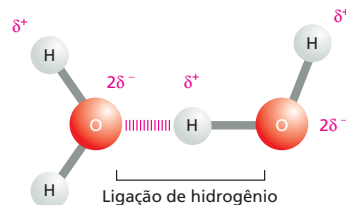
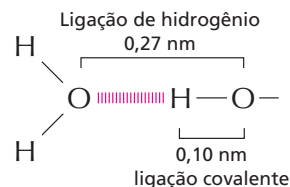
Entre um fosfato e um grupo hidroxila livre pode ser formado um éster de fosfato. Grupos fosforila são geralmente ligados a proteínas deste modo.

A combinação de um grupo fosfato e de um grupo carboxila, ou de dois ou mais grupos fosfato, produz um anidrido ácido.

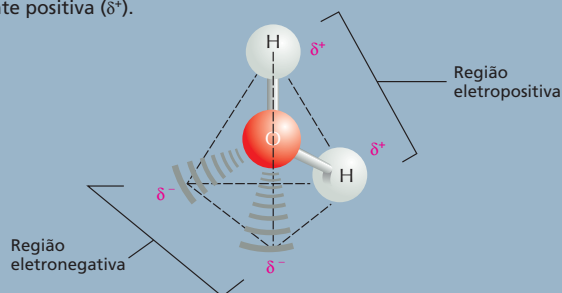
Ligação acil fosfato de alta energia (anidrido ácido carboxílico fosfórico) encontrada em alguns metabólicos

Anidridofosfórica – uma ligação de alta energia encontrada em moléculas como o ATP

PAINEL 2-2 Propriedades químicas da água

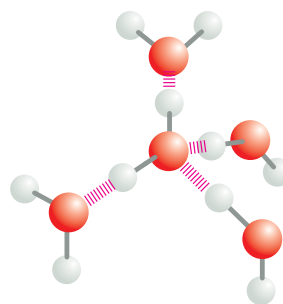
LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO

Por serem polarizadas, duas moléculas de água que estejam adjacentes podem formar uma ligação conhecida como **ligação de hidrogênio**. A ligação de hidrogênio tem apenas 1/20 da intensidade de uma ligação covalente.

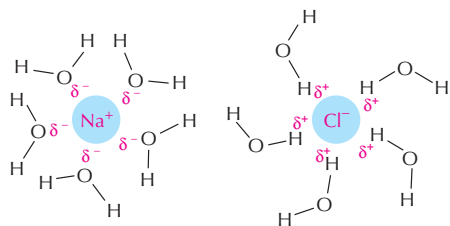
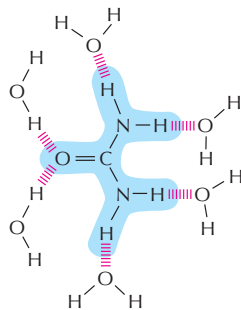
A ligação de hidrogênio é mais intensa quando os três átomos ficam em uma linha reta.

Comprimento da ligação

ÁGUA

Dois átomos que estejam unidos por uma ligação covalente podem exercer atrações diferentes sobre os elétrons da ligação. Nesses casos, a ligação é polar, uma das extremidades tem uma leve carga negativa (δ⁻), e a outra tem uma carga levemente positiva (δ⁺).

Embora a molécula de água tenha uma carga absoluta neutra (pois tem o mesmo número de elétrons e de prótons), os elétrons se distribuem assimetricamente, fazendo com que a molécula seja polar. O núcleo de oxigênio puxa elétrons do núcleo de hidrogênio, deixando-o com uma pequena carga líquida positiva. A densidade eletrônica excessiva do átomo de oxigênio cria regiões negativas fracas nas extremidades de dois cantos de um tetraedro imaginário. Nestas páginas, serão revisadas as propriedades químicas da água e será visto como a água influencia o comportamento das moléculas biológicas.

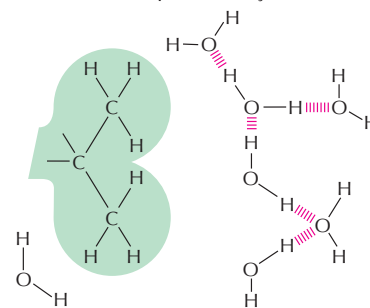
ESTRUTURA DA ÁGUA

As moléculas de água se juntam transitoriamente entre si formando uma rede de ligações de hidrogênio.

A natureza coesiva da água é responsável por muitas das suas propriedades incomuns, como a alta tensão superficial, o calor específico e o calor de vaporização elevados.

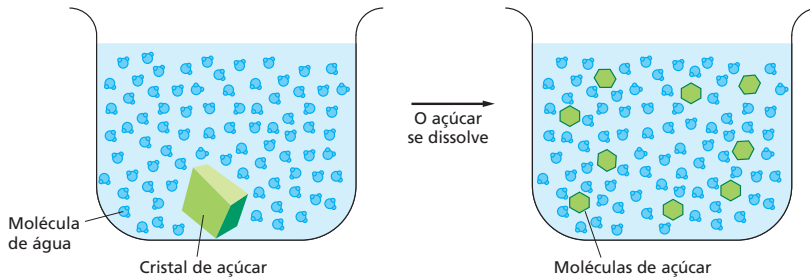
MOLÉCULAS HIDROFÍLICAS

Substâncias que se dissolvem facilmente em água são denominadas **hidrofílicas**. Elas são compostas por íons e por moléculas polares que podem atrair moléculas de água por meio dos efeitos das cargas elétricas. Moléculas de água rodeiam cada íon ou cada molécula polar presentes na superfície de substâncias sólidas e os carregam para a solução.

Substâncias iônicas, como o cloreto de sódio, dissolvem-se porque as moléculas de água são atraídas para a carga positiva (Na^+) ou para a carga negativa (Cl^-) de cada íon.

Substâncias polares, como a ureia, dissolvem-se porque suas moléculas formam ligações de hidrogênio com as moléculas de água que as rodeiam.

MOLÉCULAS HIDROFÓBICAS

Substâncias com preponderância de ligações não covalentes são geralmente insolúveis em água e são denominadas **hidrofóbicas**. As moléculas de água não são atraídas por esse tipo de molécula, e, assim, a água tem pouca tendência em circundar e carregar essas moléculas para a solução

Os hidrocarbonetos que contêm muitas ligações C–H são excepcionalmente hidrofóbicos

A ÁGUA COMO SOLVENTE

Muitas substâncias, como o açúcar comum, dissolvem-se em água. Isto é, suas moléculas se separam umas das outras, mas cada uma delas fica rodeada por moléculas de água.

Quando uma substância se dissolve em um líquido, a mistura é denominada solução. A substância dissolvida (o açúcar, nesse caso) é o soluto, e o líquido no qual ela se dissolve (a água, nesse caso) é o solvente. A água é um solvente excelente para muitas substâncias em razão das suas ligações polares.

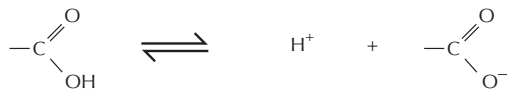
ÁCIDOS

As substâncias que, em solução, liberam íons hidrogênio são chamadas de ácidos.

$$HCl \longrightarrow H^+ + Cl^-$$

Ácido clorídrico → Íon hidrogênio + Íon cloreto

Muitos dos ácidos importantes para as células se dissociam apenas parcialmente, sendo, por isso, ácidos fracos. Por exemplo, o grupo carboxila (–COOH) se dissocia liberando um íon hidrogênio para a solução.

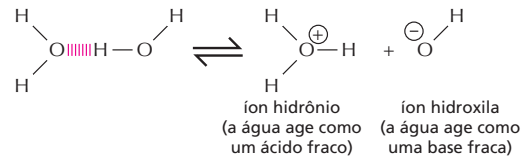
$$-COOH \rightleftharpoons H^+ + -COO^-$$

(Ácido fraco)

Observe que essa reação é reversível.

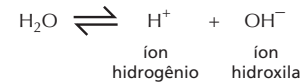
TROCAS DE ÍON HIDROGÊNIO

O íon hidrogênio (H^+), carregado positivamente, pode passar espontaneamente de uma à outra molécula de água, criando assim, duas espécies iônicas.

$$H_2O \cdots H{-}O{-}H \rightleftharpoons H_3O^+ + OH^-$$

íon hidrônio (a água age como um ácido fraco) — íon hidroxila (a água age como uma base fraca)

geralmente isto é escrito como:

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

íon hidrogênio — íon hidroxila

Uma vez que esse processo é rapidamente reversível, os íons + hidrogênio estão constantemente indo e vindo de uma molécula de água à outra. A água pura contém uma concentração constante de íons hidrogênio e de íons hidroxila (10^{-7} M cada um)

pH

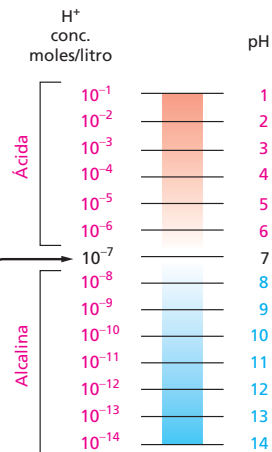
A acidez de uma solução é definida pela concentração de íons H^+ que ela possui. Por conveniência, usa-se a escala de pH, onde

$$pH = -\log_{10}[H^+]$$

Para a água pura

$[H^+] = 10^{-7}$ moles/litro

pH = 7,0

	H^+ conc. moles/litro	pH
Ácida	10^{-1}	1
	10^{-2}	2
	10^{-3}	3
	10^{-4}	4
	10^{-5}	5
	10^{-6}	6
	10^{-7}	7
Alcalina	10^{-8}	8
	10^{-9}	9
	10^{-10}	10
	10^{-11}	11
	10^{-12}	12
	10^{-13}	13
	10^{-14}	14

BASES

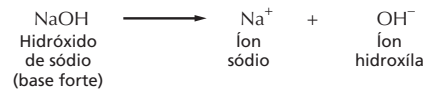
As substâncias que fazem com que o número de íons hidrogênio das soluções diminua são denominadas bases. Algumas bases, como a amônia, se combinam diretamente com íons hidrogênio.

$$NH_3 + H^+ \longrightarrow NH_4^+$$

Amônia + Íon hidrogênio → Íon amônio

Outras bases, como o hidróxido de sódio, reduzem o número de íons H^+ de maneira indireta por produzirem íons OH^- que então se combinam diretamente com íons H^+ formando água.

$$NaOH \longrightarrow Na^+ + OH^-$$

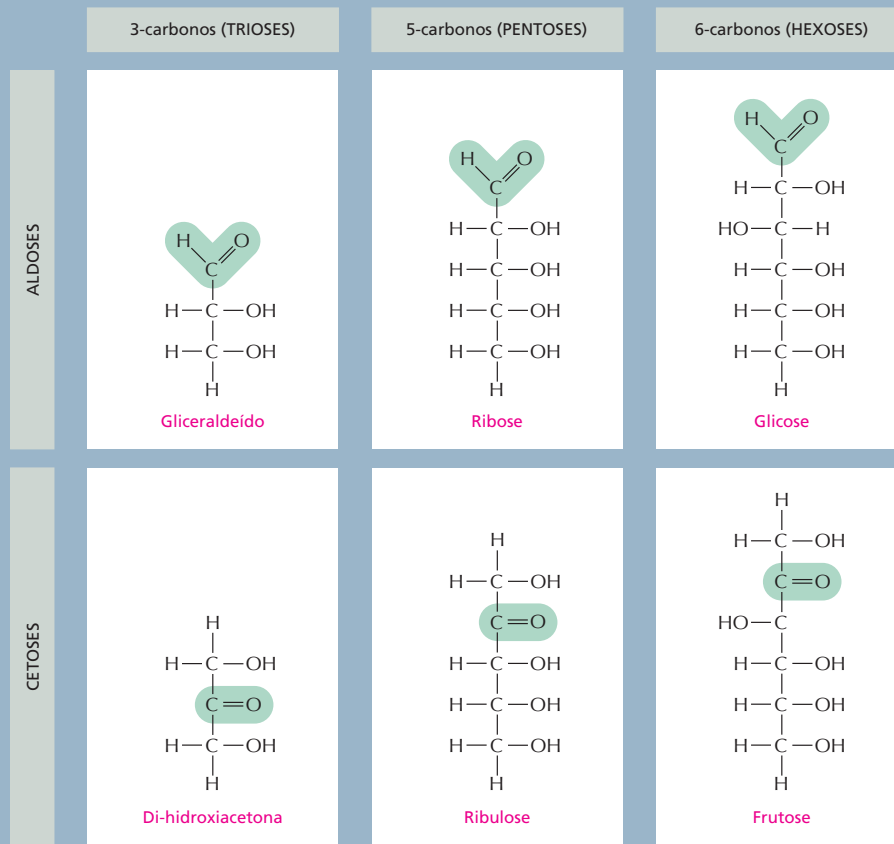
Hidróxido de sódio (base forte) → Íon sódio + Íon hidroxila

Muitas das bases encontradas nas células estão particularmente associadas a íons H^+ e são denominadas bases fracas. Isso acontece com compostos que contenham um grupo amino ($-NH_2$), que tem uma tendência fraca em aceitar de maneira reversível um íon H^+ da água, aumentando assim a quantidade de íons OH^- livres.

$$-NH_2 + H^+ \rightleftharpoons -NH_3^+$$

PAINEL 2-3 Esquema de alguns tipos de açúcares

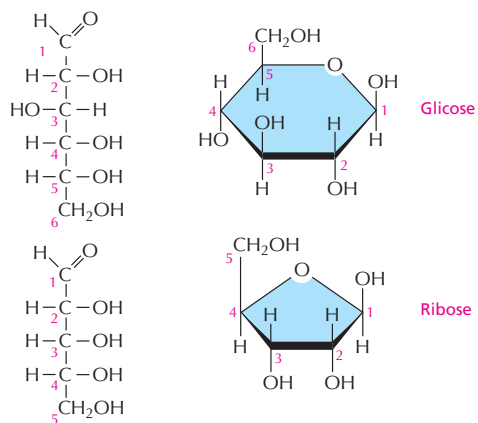
MONOSSACARÍDEOS

Os monossacarídeos geralmente têm a fórmula geral $(CH_2O)_n$, em que *n* pode ser 3, 4, 5 ou 6 e ainda dois ou mais grupos hidroxila. Aqueles que contêm um grupo aldeído ($-C{=}O$, H) são então chamados de aldoses, e os que contêm um grupo cetona ($>C=O$) são denominados cetoses.

	3-carbonos (TRIOSES)	5-carbonos (PENTOSES)	6-carbonos (HEXOSES)
ALDOSES	Gliceraldeído	Ribose	Glicose
CETOSES	Di-hidroxiacetona	Ribulose	Frutose

FORMAÇÃO DO ANEL

Em solução aquosa, os grupos aldeído ou cetona de uma molécula de açúcar tendem a reagir com um grupo hidroxila da mesma molécula, fechando a molécula em uma forma cíclica.

Glicose

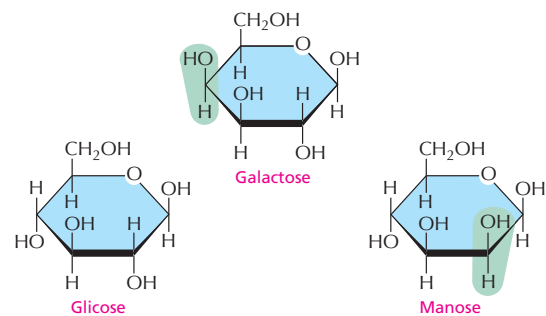
Ribose

Observe que cada átomo de carbono recebe um número.

ISÔMEROS

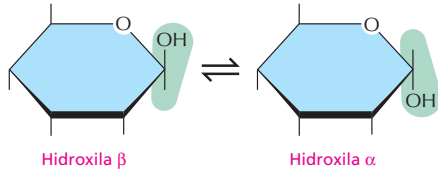
Muitos monossacarídeos diferem apenas quanto ao arranjo espacial dos seus átomos, isto é, eles são isômeros. Por exemplo, glicose, galactose e manose possuem a mesma fórmula ($C_6H_{12}O_6$), mas o arranjo dos grupos ao redor de um ou de dois átomos de carbono é diferente em cada uma dessas moléculas.

Galactose

Glicose

Manose

Essas pequenas diferenças produzem apenas leve modificação nas propriedades químicas dos açúcares, mas elas são reconhecidas por enzimas e outras proteínas de modo que os efeitos biológicos podem ser muito importantes.

LIGAÇÕES α E β

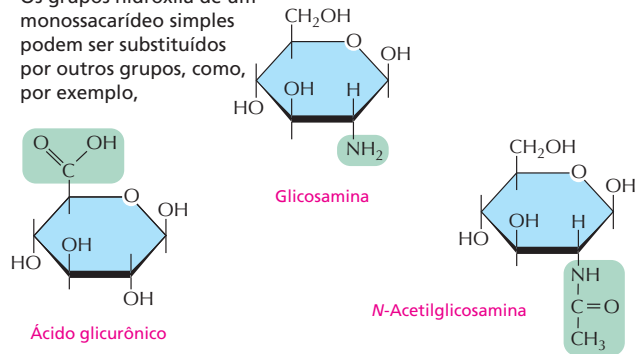
O grupo hidroxila do carbono que carrega o aldeído ou a cetona pode mudar facilmente de uma posição à outra. Essas duas posições possíveis são denominadas de α e β.

Tão logo um açúcar se liga a outro, as formas α e β permanecem fixas.

DERIVADOS DE AÇÚCARES

Os grupos hidroxila de um monossacarídeo simples podem ser substituídos por outros grupos, como, por exemplo,

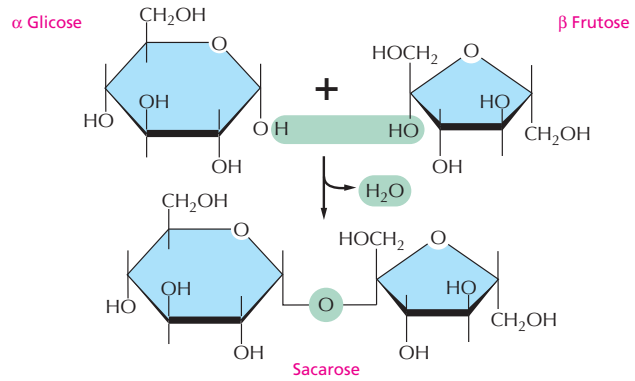
CH_2OH
O
OH
OH
H
HO
NH_2
Glicosamina

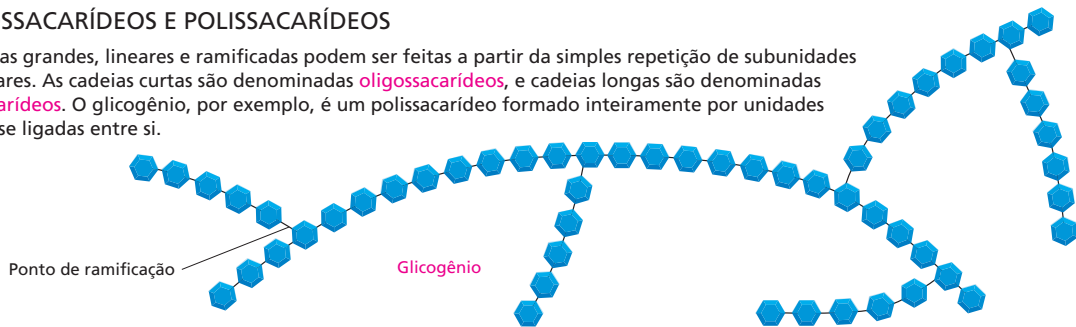
O
OH
C
O
OH
OH
HO
OH
Ácido glicurônico

CH_2OH
O
OH
OH
H
HO
NH
C=O
CH_3
N-Acetilglicosamina

DISSACARÍDEOS

O carbono que carrega o aldeído ou a cetona pode reagir com qualquer grupo hidroxila de uma segunda molécula de açúcar e formar um dissacarídeo.
Os dissacarídeos mais comuns são

maltose (glicose + glicose)
lactose (galactose + glicose)
sacarose (glicose + frutose)

As reações que formam a sacarose são mostradas ao lado.

OLIGOSSACARÍDEOS E POLISSACARÍDEOS

Moléculas grandes, lineares e ramificadas podem ser feitas a partir da simples repetição de subunidades de açúcares. As cadeias curtas são denominadas oligossacarídeos, e cadeias longas são denominadas polissacarídeos. O glicogênio, por exemplo, é um polissacarídeo formado inteiramente por unidades de glicose ligadas entre si.

OLIGOSSACARÍDEOS COMPLEXOS

Em muitos casos, a sequência de açúcares não é repetitiva, e muitas moléculas diferentes são possíveis de serem formadas. Tais oligossacarídeos complexos são geralmente ligados a proteínas e a lipídeos, como o oligossacarídeo ao lado, que é parte de uma molécula da superfície da célula que caracteriza um determinado grupo sanguíneo.

PAINEL 2-4 Ácidos graxos e outros lipídeos

ÁCIDOS GRAXOS

Todos os ácidos graxos possuem grupos carboxila com uma longa cauda hidrocarbonada.

Existem centenas de tipos diferentes de ácidos graxos. Alguns têm uma ou mais ligações duplas na sua cauda hidrocarbonada e são considerados insaturados. Os ácidos graxos sem ligação dupla são saturados.

TRIACILGLICERÓIS

Os ácidos graxos são armazenados como reserva de energia (gorduras e óleos) por meio de uma ligação éster com o glicerol para formar triacilgliceróis.

Glicerol

GRUPO CARBOXILA

Se estiver livre, o grupo carboxila de um ácido graxo pode ionizar-se.

Entretanto, geralmente ele está ligado a outros grupos para formar tanto ésteres

como amidas.

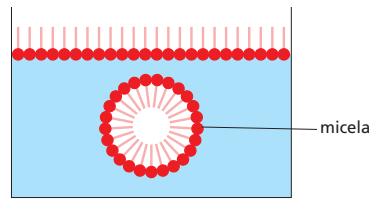
FOSFOLIPÍDEOS

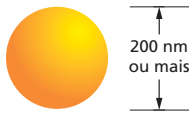
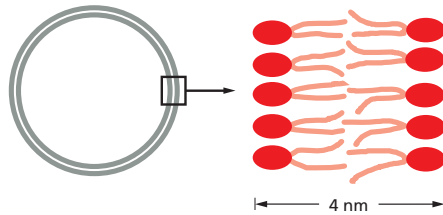
Os fosfolipídeos são os principais constituintes das membranas celulares

Nos fosfolipídeos, dois dos grupos –OH do glicerol são ligados a ácidos graxos, e o terceiro grupo –OH é ligado ao ácido fosfórico. O fosfato é ainda ligado a um de uma variedade de pequenas grupos polares (alcoóis).

AGREGADOS DE LIPÍDEOS

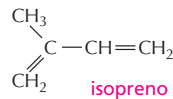
Os ácidos graxos possuem uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica.

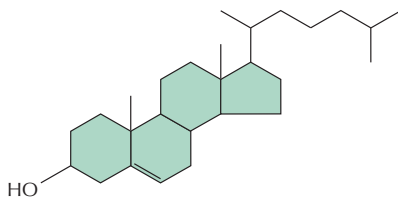
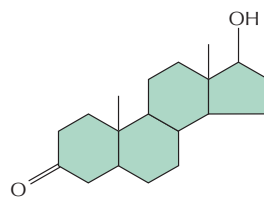
Na água, eles podem formar um filme na superfície ou então pequenas micelas.

Seus derivados podem formar grandes agregados, cuja união é mantida por forças hidrofóbicas:

No citoplasma, os triacilgliceróis formam grandes gotículas de gorduras esféricas.

Os fosfolipídeos e os glicolipídeos formam bicamadas lipídicas autosselantes, que são base de todas as membranas celulares.

OUTROS LIPÍDEOS

Os lipídeos são definidos como moléculas celulares insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Outros dois tipos comuns de lipídeos são os esteróis e os poli-isoprenoides.

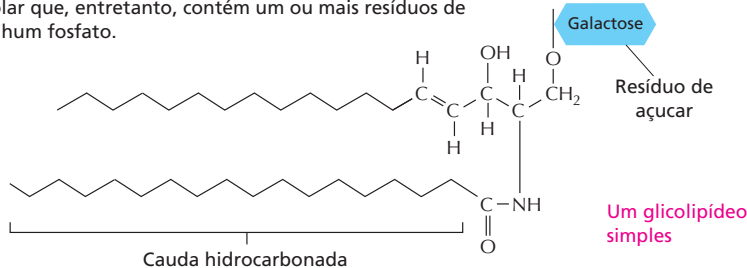
CH_3–C(=CH_2)–CH=CH_2

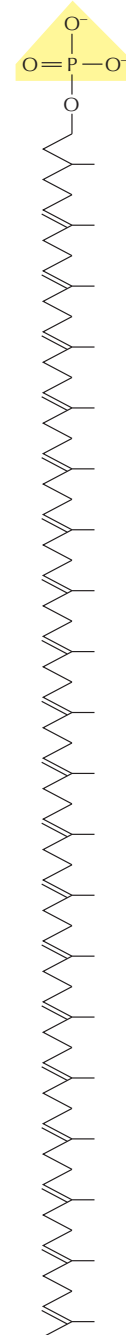
isopreno

ESTEROIDES

Os esteroides têm em comum uma estrutura de anéis múltiplos.

Colesterol – encontrado em muitas membranas

Testosterona – hormônio esteroide masculino

GLICOLIPÍDEOS

Assim como os fosfolipídeos, esses compostos são formados por uma região hidrofóbica, constituída por duas longas caudas hidrocarbonadas e por uma região polar que, entretanto, contém um ou mais resíduos de açúcares e nenhum fosfato.

Um glicolipídeo simples

POLI-ISOPRENOIDES

Polímeros do isopreno com cadeia longa

Dolicol fosfato – usado para carrear açúcares ativados na síntese ligada à membrana de glicoproteínas e de outros polissacarídeos.

PAINEL 2-5 Os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas

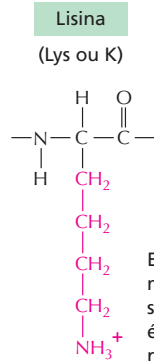
FAMÍLIAS DE AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos comuns são agrupados segundo suas cadeias laterais sejam

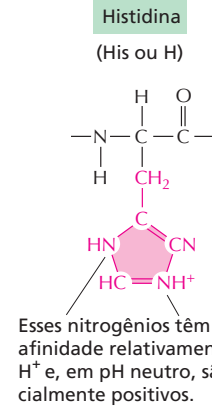
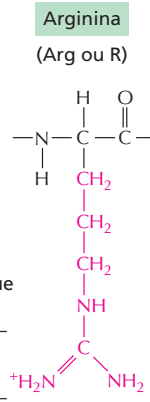
ácida
básica
polar não carregada
apolar

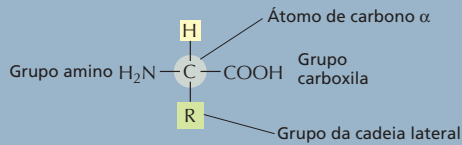
A esses 20 aminoácidos é dado tanto uma abreviatura de três como de uma letra.

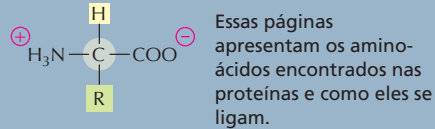
Assim: alanina = Ala = A

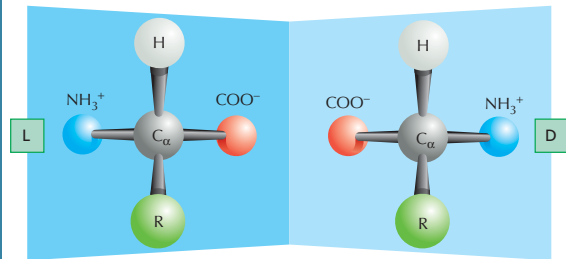
CADEIAS LATERAIS BÁSICAS

Lisina (Lys ou K)

Histidina (His ou H)

Esses nitrogênios têm uma afinidade relativamente fraca por H^+ e, em pH neutro, são apenas parcialmente positivos.

AMINOÁCIDOS

A fórmula geral dos aminoácidos é

R é uma das 20 diferentes cadeias laterais comuns. Em pH 7,0, tanto os grupos amino como carboxila estão ionizados.

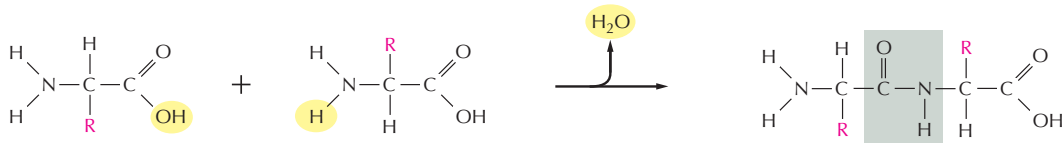
Essas páginas apresentam os aminoácidos encontrados nas proteínas e como eles se ligam.

ISÔMEROS ÓPTICOS

O carbono α é assimétrico, permitindo assim duas imagens especulares (ou estereo-) isômeros, L e D

As proteínas são constituídas exclusivamente de L-aminoácidos.

LIGAÇÃO PEPTÍDICA

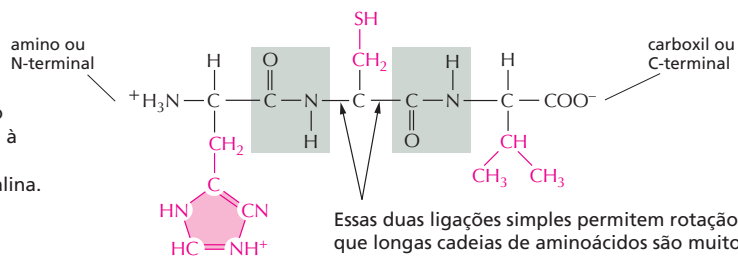
Os aminoácidos são unidos normalmente por meio de ligação amida, denominada ligação peptídica.

Os quatro átomos de uma ligação peptídica (*quadro cinza*) formam uma unidade planar rígida. Não há rotação ao redor da ligação C–N.

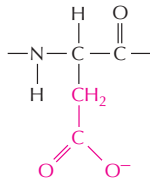
H_2O

As proteínas são polímeros longos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, e eles são sempre escritos com o N-terminal à esquerda. A sequência desses tripeptídeo é histidina-cisteína-valina.

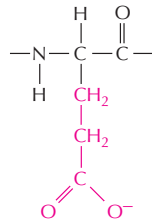
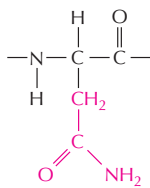
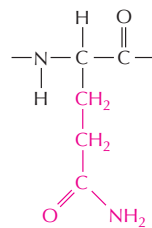
amino ou N-terminal

carboxil ou C-terminal

Essas duas ligações simples permitem rotação, de modo que longas cadeias de aminoácidos são muito flexíveis.

CADEIAS LATERAIS ÁCIDAS

Ácido aspártico (Asp ou D)

Cadeia lateral: $-CH_2-COO^-$

Ácido glutâmico (Glu ou E)

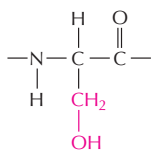
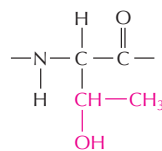
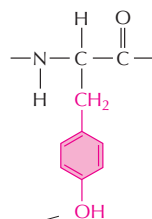
Cadeia lateral: $-CH_2-CH_2-COO^-$

CADEIAS LATERAIS POLARES NÃO CARREGADAS

Serina (Ser ou S)

Cadeia lateral: $-CH_2-OH$

Treonina (Thr ou T)

Cadeia lateral: $-CH(OH)-CH_3$

Tirosina (Tir ou Y)

Cadeia lateral: $-CH_2-C_6H_4-OH$

O grupo –OH é polar.

CADEIAS LATERAIS APOLARES

Alanina (Ala ou A)

Cadeia lateral: $-CH_3$

Valina (Val ou V)

Cadeia lateral: $-CH(CH_3)_2$

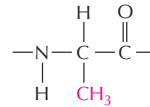
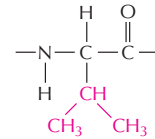
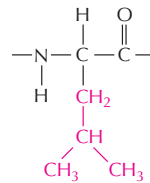
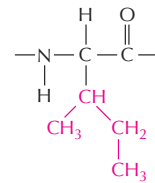
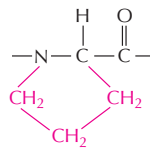
Leucina (Leu ou L)

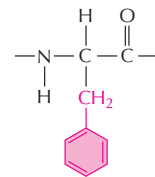
Cadeia lateral: $-CH_2-CH(CH_3)_2$

Isoleucina (Ile ou I)

Cadeia lateral: $-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$

Prolina (Pro ou P)

Cadeia lateral: $CH_2-CH_2-CH_2$ (ligada ao N)

(um iminoácido)

Fenilalanina (Phe ou F)

Cadeia lateral: $-CH_2-C_6H_5$

Metionina (Met ou M)

Cadeia lateral: $-CH_2-CH_2-S-CH_3$

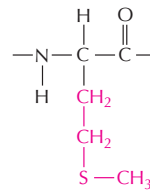
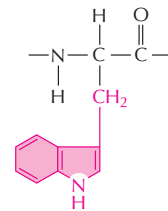
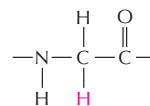
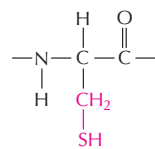
Triptofano (Trp ou W)

Cadeia lateral: $-CH_2-$ (indol, N–H)

Glicina (Gly ou G)

Cadeia lateral: $-H$

Cisteína (Cys ou C)

Cadeia lateral: $-CH_2-SH$

Entre as cadeias laterais de dois resíduos de cisteína podem formar-se ligações dissulfídicas.

$$- -CH_2-S-S-CH_2- -$$

PAINEL 2-6 Apanhado geral sobre os nucleotídeos

BASES

FOSFATOS

Os fosfatos geralmente são ligados à hidroxila do C5 da ribose ou da desoxirribose (designada como 5'). Mono, di e trifosfatos são comuns.

O fosfato faz com que os nucleotídeos sejam carregados negativamente.

NUCLEOTÍDEOS

Um nucleotídeo consiste em uma base que contém nitrogênio, um açucar de cinco carbonos e um ou mais grupos fosfato.

Os nucleotídeos são as unidades dos ácidos nucleicos.

LIGAÇÃO BASE-AÇÚCAR

A base é ligada ao mesmo carbono (C1) usado na ligação açúcar-açúcar.

AÇÚCARES

NOMENCLATURA

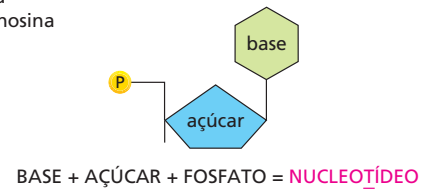
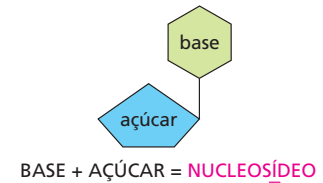
Os nomes podem ser confusos, mas as abreviações são claras.

BASE	NUCLEOSÍDEO	ABREV.
adenina	adenosina	A
guanina	guanosina	G
citosina	citidina	C
uracila	uridina	U
timina	timidina	T

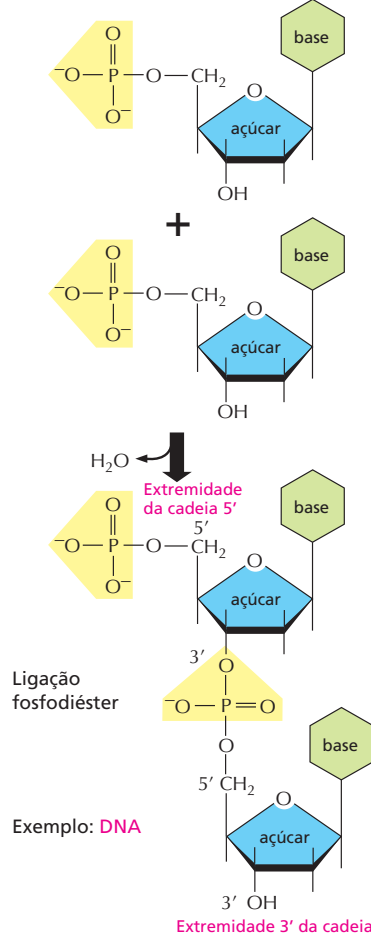
Os nucleotídeos são abreviados por três letras maiúsculas. A seguir, alguns exemplos:

AMP = monofosfato de adenosina
dAMP = monofosfato de deoxiadenosina
UDP = difosfato de uridina
ATP = trifosfato de adenosina

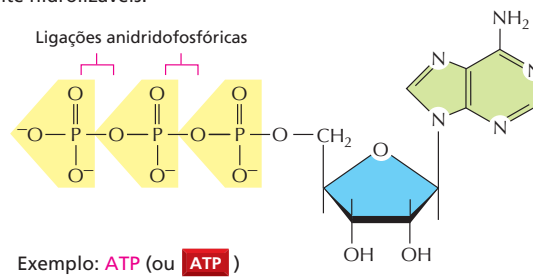
BASE + AÇÚCAR = NUCLEOSÍDEO

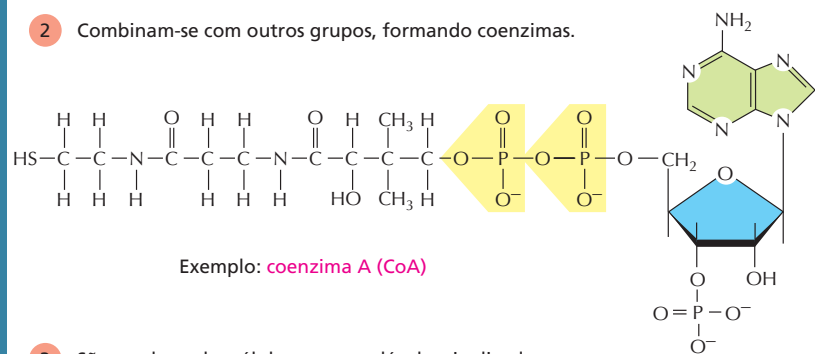
BASE + AÇÚCAR + FOSFATO = NUCLEOTÍDEO

ÁCIDOS NUCLEICOS

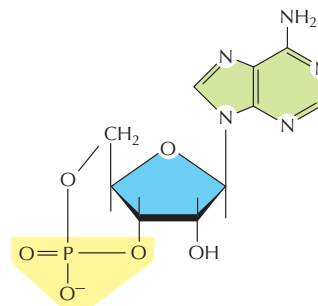
Os nucleotídeos são ligados entre si por meio de ligações fosfodiéster entre os átomos de carbono 5′ e 3′, formando ácidos nucleicos. A sequência linear de nucleotídeos em uma cadeia de ácido nucleico é geralmente abreviada por um código de uma letra, A—G—C—T—T—A—C—A, com a extremidade 5′ da cadeia colocada à esquerda.

Exemplo: DNA

OS NUCLEOTÍDEOS TÊM MUITAS OUTRAS FUNÇÕES

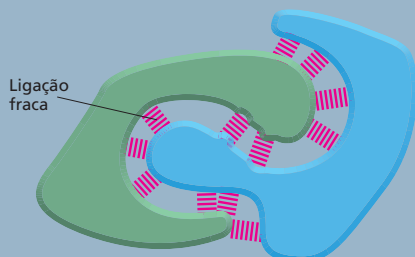
1 Carregam energia química nas suas ligações anidridofosfóricas facilmente hidrolizáveis.

Exemplo: ATP (ou ATP)

2 Combinam-se com outros grupos, formando coenzimas.

Exemplo: coenzima A (CoA)

3 São usados pelas células como moléculas sinalizadoras.

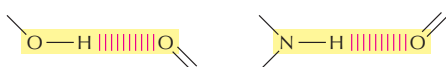
Exemplo: AMP cíclico

PAINEL 2-7 Os principais tipos de ligações fracas não covalentes

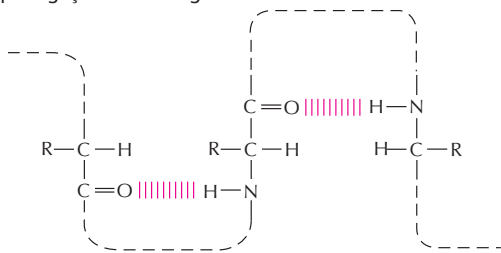
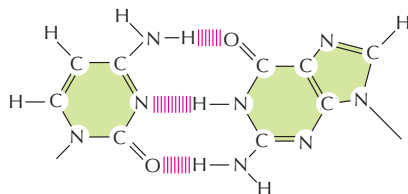
LIGAÇÕES QUÍMICAS FRACAS

As moléculas orgânicas podem interagir com outras moléculas por meio de forças não covalentes de curta distância conhecidas como *ligações não covalentes*: atrações de van der Waals, atrações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. A repulsão de grupos hidrofóbicos pela água também é importante para organizar as macromoléculas biológicas.

As ligações químicas fracas têm menos de 1/20 da intensidade de uma ligação covalente, que é uma ligação forte. Elas têm força suficiente para fazerem uma associação forte apenas quando estiverem em grande número simultaneamente.

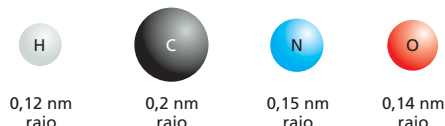
LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO

Como foi descrito (Painel 2-2, p. 66-67), há formação de uma ligação de hidrogênio quando um átomo de hidrogênio é ''sanduichado'' entre dois átomos que atraem elétrons, geralmente oxigênio ou nitrogênio.

A ligação de hidrogênio é mais forte quando os três átomos estiverem alinhados em uma reta.

Exemplos em macromoléculas:

Aminoácidos de cadeias polipeptídicas mantidos juntos por ligações de hidrogênio.

Duas bases, G e C, do DNA ou do RNA mantidas juntas por ligação de hidrogênio.

ATRAÇÕES DE VAN DER WAALS

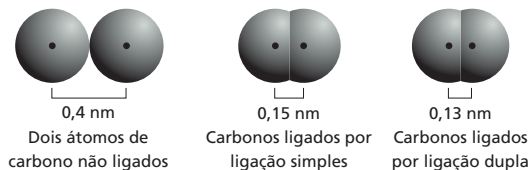
Se dois átomos estiverem muito próximos, eles terão uma repulsão recíproca muito forte. Em virtude disso, geralmente um átomo pode ser tratado como uma esfera de raio fixo. O ''tamanho'' característico de cada átomo é determinado pelo raio de van der Waals específico de cada um. A distância de contato entre dois átomos quaisquer que estiverem ligados por ligações não covalentes será a soma dos seus raios de van der Waals.

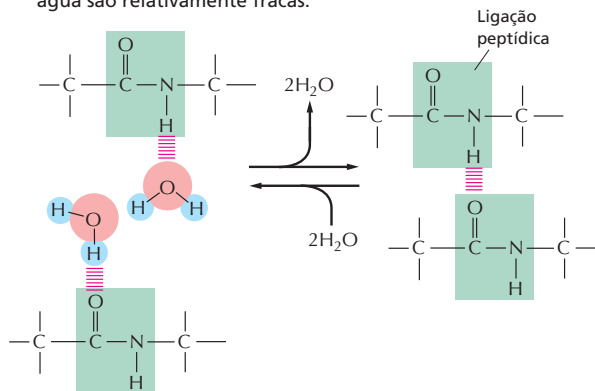
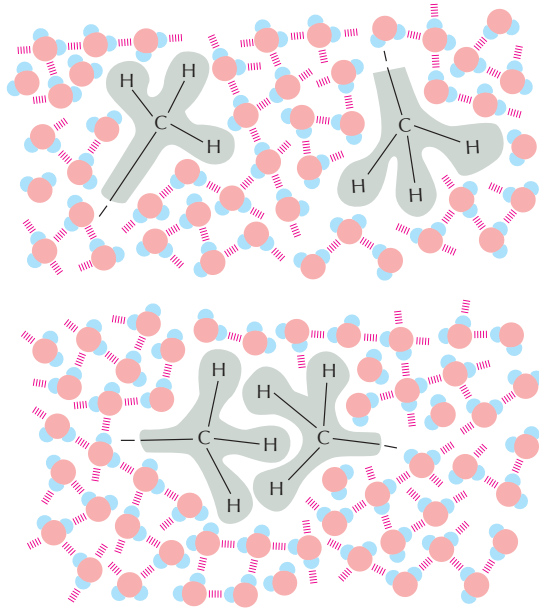
0,12 nm raio	0,2 nm raio	0,15 nm raio	0,14 nm raio

Em distâncias muito curtas, cada um dos dois átomos apresenta interações de ligação fracas, porque suas cargas elétricas flutuam. Dessa maneira, os dois átomos serão atraídos um ao outro até que a distância entre seus núcleos seja aproximadamente igual à soma dos seus raios de van der Waals. Embora individualmente as atrações de van der Waals sejam muito fracas, elas, em razão do envolvimento de muitos átomos, tornam-se importantes no caso em que as superfícies de duas macromoléculas puderem se encaixar muito proximamente.

Observe que, quando dois átomos estiverem formando uma ligação covalente, os centros dos dois átomos (os dois núcleos atômicos) estarão muito mais próximos do que a soma dos dois raios de van der Waals. Assim,

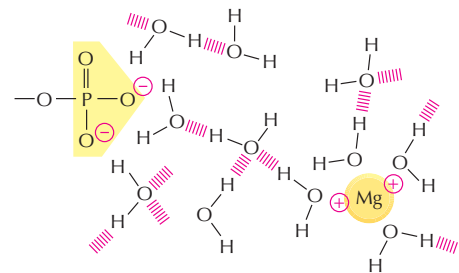
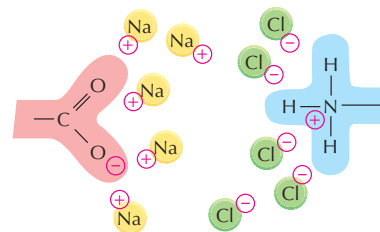
0,4 nm
Dois átomos de carbono não ligados

0,15 nm
Carbonos ligados por ligação simples

0,13 nm
Carbonos ligados por ligação dupla

LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO NA ÁGUA

Quaisquer moléculas que puderem formar ligações de hidrogênio entre si poderão, alternativamente, formar ligações de hidrogênio com moléculas de água. Em razão dessa competição com as moléculas de água, as ligações de hidrogênio formadas entre duas moléculas dissolvidas em água são relativamente fracas.

FORÇAS HIDROFÓBICAS

A água força os grupos hidrofóbicos a ficarem juntos porque, ao fazer isso, ficam diminuídos os efeitos de desagregação desses grupos na rede de água mantida por ligações de hidrogênio. Algumas vezes, diz-se que grupos hidrofóbicos mantidos unidos dessa maneira são mantidos unidos por "ligação hidrofóbica", mesmo que na verdade a atração entre os grupos hidrofóbicos seja provocada por repulsão pelas moléculas de água.

ATRAÇÕES ELETROSTÁTICAS EM SOLUÇÕES AQUOSAS

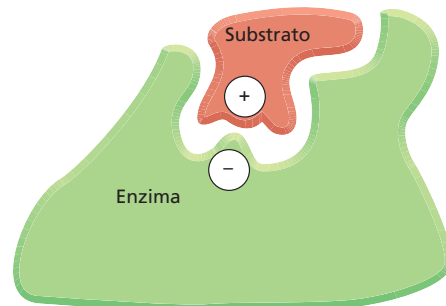
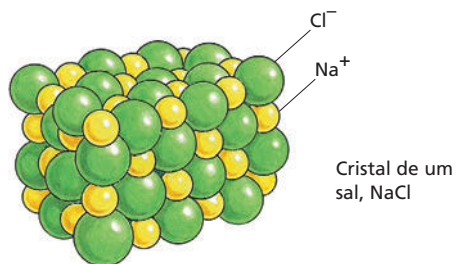
Os grupos carregados são protegidos por suas interações com moléculas de água. Desse modo, atrações eletrostáticas são muito fracas na água.

De maneira semelhante, íons presentes na solução podem agregar-se ao redor de grupos carregados e enfraquecer ainda mais essas atrações.

Embora sejam enfraquecidas por água e sais, as ligações iônicas são muito importantes para os sistemas biológicos. Por exemplo, enzimas que liguem um substrato com carga positiva geralmente têm uma carga negativa da cadeia lateral de algum aminoácido apropriadamente localizada.

LIGAÇÕES IÔNICAS

Ocorrem interações de atração tanto entre grupos com uma carga completa (ligação iônica) como entre grupos parcialmente carregados.

As forças de atração entre as duas cargas, δ^+ e δ^-, diminuem rapidamente à medida que a distância entre as cargas aumenta.

Na ausência de água, as forças iônicas são muito fortes. Elas são responsáveis pela dureza de minerais, como o mármore e a ágata, e pela formação dos cristais do sal de cozinha, NaCl.

Cristal de um sal, NaCl

CONCEITOS ESSENCIAIS

- As células vivas obedecem às mesmas leis da física e da química que regem as coisas não vivas. Como toda outra forma de matéria, elas são compostas de átomos, que são as menores unidades dos elementos químicos que mantêm propriedades químicas inconfundíveis.
- Os átomos são feitos de partículas menores. O núcleo dos átomos contém prótons, que têm carga positiva, e nêutrons sem carga. O núcleo é rodeado por uma nuvem de elétrons, carregada negativamente.
- O número de elétrons de um átomo é igual ao número de prótons que existem em seu núcleo. O núcleo de diferentes isótopos do mesmo elemento contém o mesmo número de prótons, mas um número diferente de nêutrons.
- As células vivas são feitas de um número limitado de elementos, quatro dos quais (C, H, N e O) perfazem até 96,5% da massa das células.
- As propriedades químicas de um átomo são determinadas pelo número e pela organização de seus elétrons. Um átomo é mais estável quando todos os seus elétrons estão nos seus menores níveis de energia possíveis e quando cada camada eletrônica está completamente preenchida.
- Forma-se uma ligação química entre átomos quando os elétrons passam a uma organização mais estável. Agrupamentos de dois ou mais átomos mantidos unidos por ligações químicas são conhecidos como moléculas.
- Quando um elétron salta de um átomo a outro, formam-se dois íons de cargas opostas, e cria-se uma ligação iônica pela atração mútua entre esses átomos carregados.
- A ligação covalente consiste no compartilhamento de um par de elétrons entre átomos adjacentes. Se dois pares de elétrons são compartilhados, forma-se uma ligação dupla.
- Os organismos vivos contêm um conjunto característico e restrito de moléculas com base no carbono que, essencialmente, é o mesmo para todas as espécies de organismos vivos. As principais categorias são os açúcares, os ácidos graxos, os aminoácidos e os nucleotídeos.
- Os açúcares são a fonte primária de energia química para as células e podem ser incorporados em polissacarídeos para armazenar energia.
- Os ácidos graxos também são importantes no armazenamento de energia, mas sua função mais importante é a formação das membranas celulares.
- A maior parte da massa seca das células consiste em macromoléculas formadas pelos polímeros de açúcares, de aminoácidos e de nucleotídeos.
- As macromoléculas têm tamanho e complexidade intermediários entre as moléculas pequenas e as organelas celulares. Elas têm muitas propriedades extraordinárias que não podem ser deduzidas facilmente a partir das subunidades com que são feitas.
- Polímeros formados por aminoácidos formam a extraordinariamente diversa e versátil classe de macromoléculas conhecida como proteínas.
- Os nucleotídeos desempenham um papel central na transferência de energia e são as subunidades formadoras das moléculas informacionais, RNA e DNA.
- As moléculas de proteínas, RNA e DNA são sintetizadas a partir de subunidades por repetidas reações de condensação. Cada uma dessas macromoléculas tem uma sequência única de subunidades
- Entre diferentes regiões das macromoléculas, formam-se ligações não covalentes fracas. Essas ligações podem fazer com que as macromoléculas se enovelem em uma forma tridimensional (conformação) única com uma química especial, como ocorre visivelmente nas proteínas.

TERMOS-CHAVE

ácido	escala de pH	molécula
ácido graxo	grupo químico	monômero
açúcar	hidrofílico	nucleotídeo
aminoácido	hidrofóbico	número de Avogadro
átomo	hidrólise	peso atômico
atração eletrostática	íon	peso molecular
ATP	íon hidrônio	polar
base	ligação covalente	polímero
condensação	ligação de hidrogênio	proteína
conformação	ligação iônica	próton
RNA	ligação não covalente	reação de condensação
DNA	ligação química	sequência
elétron	macromolécula	subunidade

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 2-11

Quais das seguintes afirmações estão corretas? Explique suas respostas.

A. O núcleo atômico contém prótons e nêutrons.

B. Um átomo possui mais elétrons do que prótons.

C. O núcleo é rodeado por uma membrana dupla.

D. Todos os átomos de um mesmo elemento têm o mesmo número de nêutrons.

E. O número de nêutrons determina se o núcleo de um átomo é estável ou radioativo.

F. Tanto os ácidos graxos como os polissacarídeos podem ser reservas de energia importantes para as células.

G. As ligações de hidrogênio são fracas e podem ser rompidas pela energia cinética, mas, mesmo assim, elas contribuem significativamente para a especificidade das interações entre macromoléculas.

QUESTÃO 2-12

Para obter uma ideia melhor das dimensões atômicas, considere que a página em que essas questões estão impressas é feita inteiramente do polissacarídeo celulose, cujas moléculas são descritas pela fórmula ($C_nH_{2n}O_n$), na qual *n* pode ser um número bem grande e varia de uma molécula à outra. Os pesos atômicos do carbono, hidrogênio e oxigênio são, respectivamente, 12, 1 e 16, e esta página pesa 5 g.

A. Quantos átomos de carbono existem nesta página?

B. Na celulose, quantos átomos de carbono devem ser sobrepostos para cobrir a espessura desta página (o tamanho da página é 21,2 cm × 27,6 cm, e a espessura é 0,07 mm)?

C. Considere agora o problema sob um ângulo diferente. Considere que a página é composta apenas de átomos de carbono. Um átomo de carbono tem um diâmetro de 2×10^{-10} m (0,2 nm). Quantos átomos de carbono são necessários para atingir a espessura desta página?

D. Compare suas respostas aos itens B e C e explique alguma diferença.

QUESTÃO 2-13

A. Quantos elétrons podem ser acomodados na primeira, segunda e terceiras camadas eletrônicas de um átomo?

B. Quantos elétrons os átomos dos elementos listados a seguir podem preferencialmente ganhar ou perder para que completem totalmente os níveis de energia?

hélio	ganha–	perde–
oxigênio	ganha–	perde–
carbono	ganha–	perde–
sódio	ganha–	perde–
cloro	ganha–	perde–

C. O que as respostas lhe dizem sobre as ligações que podem ser formadas entre o sódio e o cloro?

QUESTÃO 2-14

O oxigênio e o enxofre possuem propriedades químicas similares porque ambos possuem seis elétrons na camada eletrônica mais externa. Efetivamente, ambos os elementos formam moléculas com dois átomos de hidrogênio, água (H_2O) e sulfeto de hidrogênio (H_2S). Surpreendentemente, a água é líquida, e o H_2S é um gás, mesmo que o enxofre seja muito maior e pesado do que o oxigênio. Explique por que isso acontece.

QUESTÃO 2-15

Escreva a fórmula química da reação de condensação de dois aminoácidos formando uma ligação peptídica. Escreva também a fórmula da hidrólise.

QUESTÃO 2-16

Quais das seguintes afirmações estão corretas? Explique suas respostas.

A. As proteínas são tão extraordinariamente diversas porque elas são feitas a partir de uma mistura única de aminoácidos que são ligados segundo uma ordem aleatória.

B. As bicamadas lipídicas são macromoléculas feitas principalmente de subunidades fosfolipídicas.

C. Os ácidos nucleicos contêm grupos açúcar.

D. Muitos aminoácidos possuem cadeias laterais hidrofóbicas.

E. As caudas hidrofóbicas das moléculas de fosfolipídeos são repelidas pela água.

F. O DNA contém as quatro bases, A, G, U e C.

QUESTÃO 2-17

A. Quantas moléculas diferentes compostas de (a) dois, (b) três e (c) quatro aminoácidos podem ser feitas a partir do conjunto dos 20 aminoácidos de ocorrência natural?

B. Imagine que você recebeu uma mistura constituída de uma molécula de cada uma das possíveis sequências de uma pequena proteína de peso molecular de 4.800. Qual o tamanho do recipiente necessário para conter essa amostra? Considere que o peso molecular médio dos aminoácidos seja 120 dáltons.

C. O que esse cálculo lhe diz sobre a fração de possíveis proteínas que é usada atualmente pelos organismos vivos (o peso molecular médio das proteínas é de cerca de 30.000 dáltons)?

QUESTÃO 2-18

Este é um livro-texto de biologia. Explique por que os princípios químicos descritos neste capítulo são importantes no contexto da biologia celular moderna.

QUESTÃO 2-19

A. Descreva as semelhanças e as diferenças entre atrações de van der Waals e ligação de hidrogênio.

B. Qual das duas ligações pode ser formada (a) entre dois hidrogênios ligados a átomos de carbono, (b) entre um átomo de nitrogênio e um hidrogênio ligado a um átomo de carbono e (c) entre um átomo de nitrogênio e um hidrogênio ligado a um átomo de oxigênio?

QUESTÃO 2-20

Quais são as forças que determinam que o enovelamento das macromoléculas tenha uma forma única.

QUESTÃO 2-21

Diz-se que os ácidos graxos são "anfipáticos". O que esse termo significa? Como uma molécula anfipática se comporta em água? Desenhe um diagrama ilustrando sua resposta.

QUESTÃO 2-22

As fórmulas da **Figura Q2-22** estão corretas ou incorretas? Explique cada uma de suas respostas.

(A) $H_2N-C(H)(CH_2-C_6H_5)-COOH$

(B) $H_3\overset{+}{N}-C(H)(CH_2-C_6H_5)-CO\overset{-}{O}$

(C)

(D)

(E)

(F) CH_3-CH_2-OH

(G) Ligação de hidrogênio

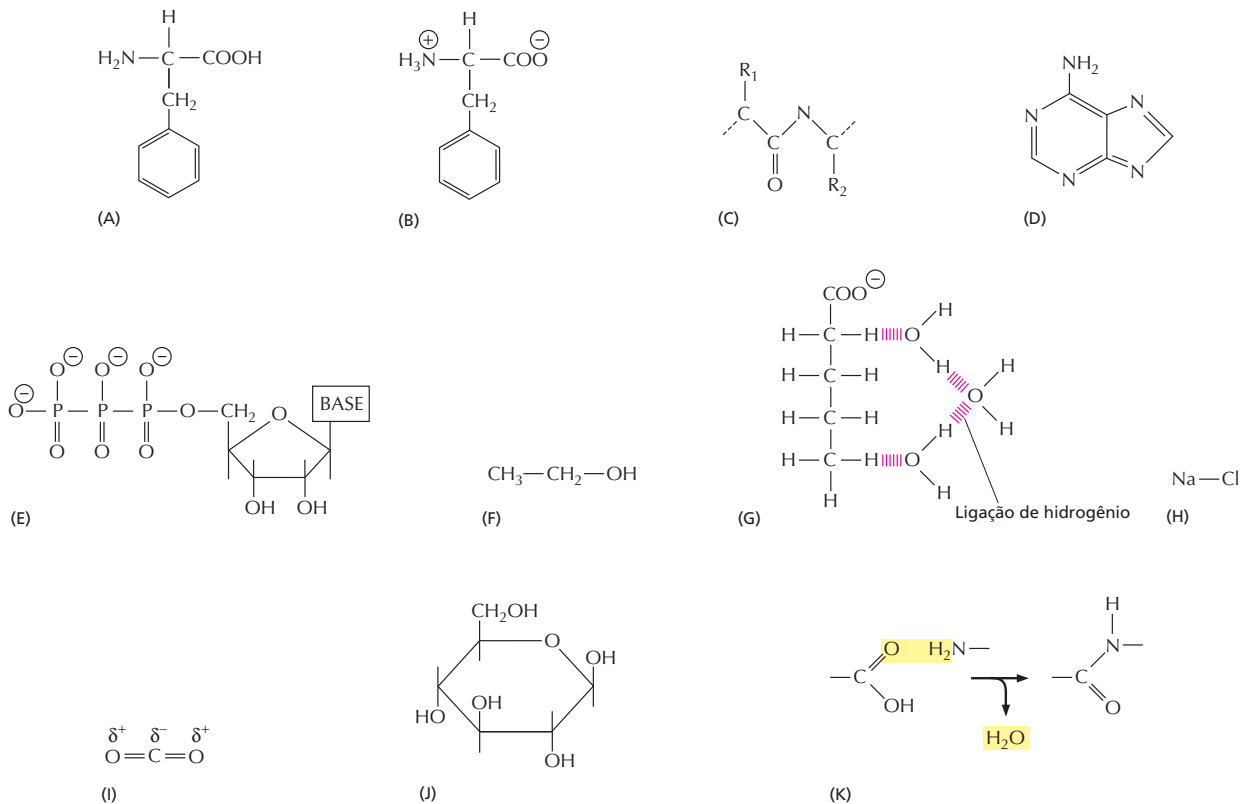
(H) $Na-Cl$

(I) $\overset{\delta^+}{O}=\overset{\delta^-}{C}=\overset{\delta^+}{O}$

(J)

(K) H_2O

Figura Q2-22

CAPÍTULO 3

Energia, Catálise e Biossíntese

USO DE ENERGIA PELAS CÉLULAS

ENERGIA LIVRE E CATÁLISE

MOLÉCULAS CARREADORAS ATIVADAS E BIOSSÍNTESE

Uma característica, mais do que qualquer outra, faz com que os seres vivos, quase que miraculosamente, pareçam diferentes da matéria não viva: eles criam e mantêm ordem em um universo que está sempre tendendo a aumentar a desordem. Para criar essa ordem, as células dos organismos vivos devem executar uma série infindável de reações químicas. Em algumas dessas reações, moléculas pequenas orgânicas – aminoácidos, açúcares, nucleotídeos e lipídeos – são usadas diretamente ou modificadas para suprir as células de todas as outras moléculas pequenas de que elas necessitam. Em outras reações, essas moléculas pequenas são usadas para construir a gama enorme e diversa de proteínas, ácidos nucleicos e outras macromoléculas que dão aos seres vivos todas as características especiais dos sistemas vivos. A célula pode ser vista como se fosse uma minúscula indústria química, executando muitos milhões de reações a cada segundo.

Para executar as inúmeras reações químicas que são necessárias para mantê-los, os organismos vivos precisam não apenas de uma fonte de átomos na forma de moléculas de alimento, mas também de uma fonte de energia. Tanto os átomos como a energia devem vir, no final de tudo, do ambiente não vivo. Neste capítulo, será discutido por que as células precisam de energia e como elas usam essa energia e átomos do meio ambiente para criar a ordem molecular que permite com que a vida seja possível.

A maioria das reações químicas que as células executam ocorreria normalmente apenas em temperaturas muito maiores do que as que existem no interior das células. Em razão disso, cada reação requer um acelerador específico das reatividades químicas para permitir que ocorram rapidamente no interior das células. Essa aceleração é dada por proteínas especializadas, denominadas *enzimas*, sendo que cada uma delas acelera, ou *catalisa*, apenas um dos inúmeros tipos possíveis de reações que uma determinada molécula pode realizar. Reações catalisadas por enzimas geralmente são conectadas em série de modo que o produto de uma reação se torna o material de partida da reação seguinte

Figura 3-1 Série de reações catalisadas por enzimas forma uma via metabólica. Cada enzima catalisa uma reação química envolvendo uma determinada molécula. Neste exemplo, um conjunto de enzimas age em série para converter a molécula A na molécula F, consistindo em uma via metabólica.

(**Figura 3-1**). As longas vias lineares de reação, ou *vias metabólicas*, que resultam são interconectadas umas às outras, formando uma rede complexa de reações interconectadas.

Mais do que ser uma inconveniência, a necessidade de catálise é benéfica, pois permite que a célula controle com precisão o seu **metabolismo**, o somatório de todas as reações químicas que ela precisa executar para sobreviver, crescer e se reproduzir. Esse controle é central na química da vida.

Duas tendências de reações opostas ocorrem nas células: as vias *catabólicas* e as vias *anabólicas*. As vias catabólicas (**catabolismo**) degradam os alimentos em moléculas menores, gerando tanto uma forma de energia utilizável pela célula como também as pequenas moléculas de que as células necessitam como unidades de construção de outras moléculas. As vias anabólicas (**anabolismo**) usam acopladamente a energia do catobolismo como força motriz para a síntese das diversas moléculas que formam as células. O conjunto desses dois grupos de reações constitui o metabolismo celular (**Figura 3-2**).

Os detalhes relativos a cada reação individual que compõem o metabolismo celular é objeto de estudo da *bioquímica*, e o metabolismo celular é o assunto da bioquímica, e eles não necessitam ser abordados aqui. Entretanto, os princípios gerais pelos quais as células obtêm energia do ambiente e o uso que fazem dela para criar ordem são pontos centrais da biologia celular. Este capítulo começará discutindo por que, para manter os organismos vivos, é necessário um suprimento constante de energia. Esses princípios são resumidos neste capítulo. Inicialmente, será discutido por que é necessário um suprimento de energia constante para que os organismos se mantenham vivos. Finalmente, serão discutidas as moléculas que carreiam a energia que torna possível a vida.

USO DE ENERGIA PELAS CÉLULAS

As coisas não vivas, se deixadas por elas mesmas, tornam-se desordenadas: os edifícios se desmancham e os organismos mortos se se desintegram. As células vivas, pelo contrário, não apenas mantêm, mas, na realidade, também criam ordem em todos os níveis, desde estruturas em grande escala, como uma borboleta ou uma flor, até a organização das moléculas que formam os organismos (**Figura 3-3**). Essa propriedade da vida é possível devido a mecanismos celulares elaborados que extraem energia do ambiente e a convertem em energia armazenada em ligações químicas. Assim, as estruturas biológicas são capazes de manter as suas formas, mesmo que os materiais dos quais elas são feitas sejam continuamente substituídos e reciclados. O corpo de cada um tem a mesma estrutura básica que tinha 10 anos atrás, mesmo sabendo que a maioria dos átomos que contém agora não estava no corpo naquela época.

Figura 3-2 As vias catabólicas e as anabólicas, em conjunto, constituem o metabolismo celular. Observe que a maior parte da energia armazenada nas ligações químicas das moléculas dos alimentos é dissipada na forma de calor. Assim, apenas parte dessa energia pode ser convertida nas formas de energia úteis de que as células necessitam para fazer síntese de novas moléculas.

A ordem biológica se torna possível pela liberação de energia cinética pelas células

A tendência universal de as coisas se tornarem desordenadas é expressa em uma lei fundamental da física – a *segunda lei da termodinâmica.* Essa lei diz que, no universo, ou em qualquer sistema isolado (um conjunto de matéria que está completamente isolado do resto do universo), o grau de desordem somente pode crescer. Essa lei tem implicações tão profundas para seres vivos que merece ser colocada de várias maneiras.

Pode-se apresentar a segunda lei em termos de probabilidades e dizer que *o sistema mudará espontaneamente para a organização de maior probabilidade.* Considerando-se, por exemplo, uma caixa contendo 100 moedas com a face da

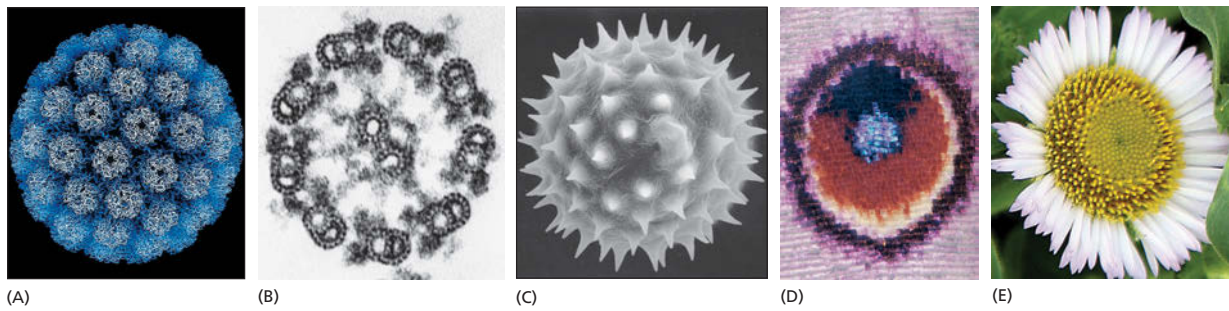
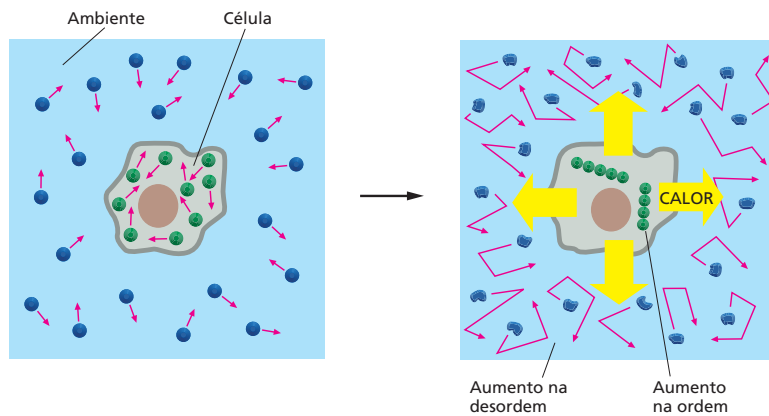



Figura 3-3 As estruturas biológicas são altamente ordenadas. Padrões espaciais bem definidos, bonitos e ornamentados podem ser encontrados em cada um dos níveis de organização dos organismos vivos. Em ordem de tamanho crescente: (A) moléculas de proteína na capa de um vírus (um parasita que, embora tecnicamente não vivo, contém os mesmos tipos de moléculas encontradas nas células vivas); (B) feixe regular de microtúbulos da cauda de um espermatozoide visto em secção transversal; (C) contorno da superfície de um grão de pólen (uma única célula); (D) foto ampliada da asa de uma borboleta, mostrando o padrão criado pelas escamas, cada uma sendo o produto de uma única célula; (E) flor com arranjo espiralado de sementes, feito de milhões de células. (A, cortesia de Robert Grant, Stéphane Crainic, e James M. Hogle; B, cortesia de Lewis Tilney; C, cortesia de Colin MacFarlane e Chris Jeffree; D, cortesia de Kjell B. Sandved.)

cara virada para cima, uma sequência de acidentes que perturbem a caixa fará com que o arranjo se altere para uma mistura com 50 moedas com cara para cima e 50 com a coroa para cima. A razão é simples: existe um número enorme de arranjos possíveis na mistura nos quais cada moeda individualmente pode chegar a um resultado de 50 a 50, mas existe somente um arranjo que mantém todas as moedas orientadas com cara para cima. Em virtude do fato de que a mistura 50 a 50 ocorre em função de um grande número de probabilidades e coloca poucas restrições na orientação de cada moeda individual, diz-se que ela é "mais desordenada". Pela mesma razão, a casa de cada pessoa se torna cada vez mais desordenada se não for feito um esforço intencional para arrumá-la. O movimento na direção da desordem é um processo espontâneo, e é necessário um esforço periódico para revertê-lo (**Figura 3-4**).

A medida do estado de desordem de um sistema é denominada **entropia** do sistema, sendo que quanto maior a desordem, maior a entropia. Assim, uma terceira maneira de expressar a segunda lei da termodinâmica é dizer que o sistema mudará espontaneamente para o estado de organização que tiver maior entropia. As células vivas, por sobreviverem, crescerem e formarem organismos complexos, estão continuamente gerando ordem como se desafiassem a segunda lei da termodinâmica. Entretanto, esse não é o caso, porque as células não são sistemas isolados. Elas tomam energia dos seus ambientes na forma de alimento, moléculas inorgânicas e fótons do sol e usam essa energia para gerar ordem para elas mesmas, forjando novas ligações químicas ou construindo grandes macromoléculas. No curso das reações químicas que geram ordem, parte da energia que as células usam é convertida em calor. O calor (ou energia cinética) é energia na sua forma mais desordenada: a colisão aleatória das mo-

Figura 3-4 A espontaneidade no sentido da desordem é uma experiência quotidiana. A restauração da ordem, entretanto, não ocorre espontaneamente. Reverter essa tendência natural à desordem necessita de um esforço intencional e um suprimento de energia. Efetivamente, a partir da segunda lei da termodinâmica, pode-se estar certo de que a intervenção humana precisa liberar calor para o ambiente em uma quantidade maior do que aquela para compensar o reordenamento dos objetos neste quarto.

Figura 3-5 As células vivas não desafiam a segunda lei da termodinâmica. No diagrama da *esquerda*, as moléculas, tanto da célula como do restante do universo (os arredores), estão desenhadas em um estado de relativa desordem. No diagrama da *direita*, a célula obteve energia das moléculas dos alimentos e liberou calor ao executar as reações que ordenaram as moléculas que possui. Como o calor aumenta a desordem do ambiente dos arredores da célula (esquematizado como flechas *dobradas* que indicam a energia cinética e moléculas distorcidas que indicam o aumento na vibração e rotação das moléculas), a segunda lei da termodinâmica, que estabelece que a quantidade de desordem do universo sempre deve aumentar, é satisfeita, e a célula pode crescer e se dividir.

léculas (analogamente às moedas que estão na caixa). Em virtude do fato de que as células não são sistemas isolados, a energia cinética que as reações geram é dispersa rapidamente pelos arredores das células, aumentando a intensidade do movimento cinético das moléculas que ali se encontram, elevando assim a entropia, ou desordem, do ambiente (Figura 3-5)

A quantidade de calor liberada pelas células deve ser grande o suficiente para que a ordem gerada dentro das células seja mais do que compensada pela grande diminuição da ordem do ambiente. Somente nesse caso é que a segunda lei da termodinâmica é cumprida, porque a entropia total do sistema – a da célula mais a do ambiente – aumentará em consequência das reações químicas do interior da célula.

De onde vem o calor que as células liberam? Segundo a *primeira lei da termodinâmica*, a energia pode ser convertida de uma forma à outra, mas não pode ser criada ou destruída. Interconversões entre algumas formas de energia estão ilustradas na Figura 3-6. A quantidade de energia sob diferentes formas poderá mudar como resultado de reações químicas intracelulares; contudo, a primeira lei da termodinâmica diz que a quantidade total do universo deve sempre ser a mesma. Por exemplo, uma célula animal pega um alimento e converte parte da energia presente nas ligações químicas das moléculas desse alimento (energia de ligação química) em movimento térmico de moléculas (energia cinética). Essa conversão de energia química em energia cinética é essencial para que as reações que ocorrem dentro da célula façam com que o universo como um todo fique mais desordenado, como a segunda lei exige.

As células não podem tirar qualquer benefício da energia cinética que elas produzem a menos que as reações que geram calor no interior das células estejam ligadas diretamente aos processos que dão origem à ordem molecular. É o acoplamento estreito entre a produção de calor e o aumento na ordem que distingue o metabolismo de uma célula do desperdício que ocorre na queima de um combustível em uma fogueira. Posteriormente, neste mesmo capítulo, será mostrado como esse acoplamento ocorre. Por enquanto, é suficiente reconhecer que é o acoplamento direto entre a "queima" das moléculas de alimentos com a geração de ordem biológica que permite que as células sejam capazes de criar e manter ilhas de ordem em um universo que tende ao caos.

Os organismos fotossintéticos utilizam a luz solar para sintetizar moléculas orgânicas

A vida de todos os animais se baseia na energia armazenada nas ligações químicas de moléculas orgânicas feitas por outros organismos, que são aproveitadas na forma de alimento. As moléculas dos alimentos também fornecem os átomos de que os animais necessitam para fazerem nova matéria viva. Alguns animais obtêm o alimento comendo outros animais. Na base da cadeia alimentar dos animais, entretanto, estão animais que se alimentam de plantas ou de outros

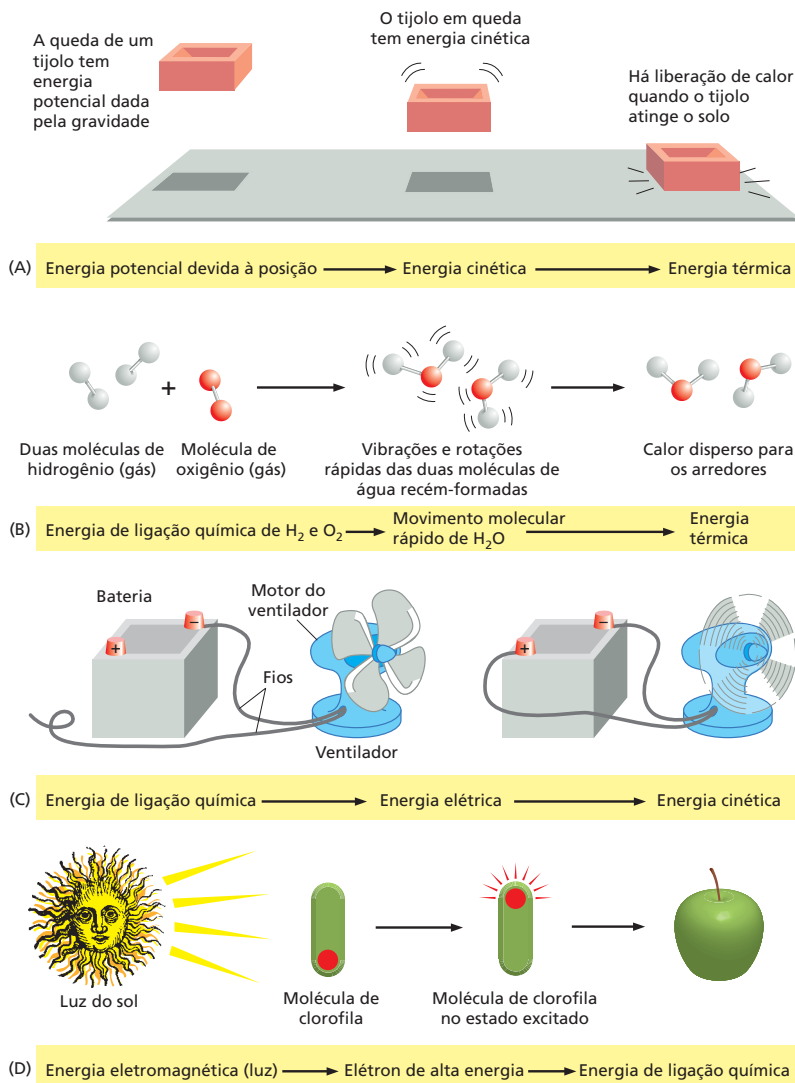



Figura 3-6 As diferentes formas de energia são interconversíveis. A energia pode ser convertida de uma forma para outra, mas, nesse processo, a quantidade total de energia se mantém conservada. Em (A), pode-se aproveitar a altura e o peso de um tijolo para prever exatamente quanto de calor é liberado no chão. Em (B), uma grande quantidade de energia de ligação química, liberada na formação da água, é inicialmente convertida na energia cinética do movimento muito rápido das duas novas moléculas de água. Entretanto, colisões com outras moléculas fazem com que instantaneamente essa energia cinética se distribua perfeitamente pelos arredores (transferência de calor), fazendo com que as novas moléculas sejam indistinguíveis de todas as demais. (C) As células podem converter energia química em energia cinética para fazer, por exemplo, motores moleculares, embora sem a conversão intermediária para energia elétrica de que um aparelho como um ventilador necessita. (D) As células também coletam energia luminosa para formar ligações químicas por meio da fotossíntese.

organismos fotossintéticos. Antes de serem comidos, esses organismos coletam energia do sol. Assim, a energia que os animais obtêm ao se alimentarem de plantas vêm originalmente do sol (Figura 3-7).

A energia solar é incorporada no mundo dos seres vivos pela **fotossíntese** – processo que, nas células, converte a energia eletromagnética da luz do sol em energia de ligação química. Os organismos fotossintéticos, que incluem plantas, algas e algumas bactérias, são capazes de obter de fontes inorgânicas todos os átomos de que necessitam. As plantas, por exemplo, usam o carbono do dióxido de carbono da atmosfera, o hidrogênio e o oxigênio da água, o nitrogênio da amônia e de nitratos do solo, e os demais elementos, de que precisam em pequenas quantidades, de sais inorgânicos do solo. Elas usam a energia derivada da luz solar para formar as ligações químicas entre esses átomos, ligando-os em unidades químicas pequenas, como os açúcares, os aminoácidos, os nucleotídeos e os ácidos graxos. Essas moléculas pequenas, por sua vez, são convertidas nas proteínas e nos ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos que formam as plantas. Todas essas substâncias servem de nutrientes para animais, fungos e bactérias não fotossintéticas que depois se alimentarão de plantas.

As reações da fotossíntese ocorrem em dois estágios: um que depende da energia do sol e outro que não depende (Figura 3-8). No primeiro estágio, que depende de luz, a energia da luz solar é capturada e armazenada transi-

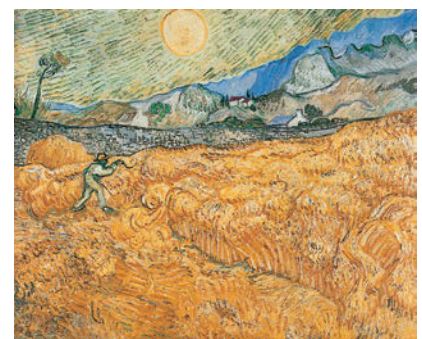



Figura 3-7 Com poucas exceções, a energia radiante da luz solar sustenta toda a vida. Capturada por plantas e alguns microrganismos pela fotossíntese, a luz solar é a fonte primária de toda a energia para o homem e os outros animais. (*Campo de Trigo Atrás do Hospital Saint-Paul com Ceifeiro*, por Vicent van Gogh. Cortesia do Museu Falkwang, Essen, Alemanha.)

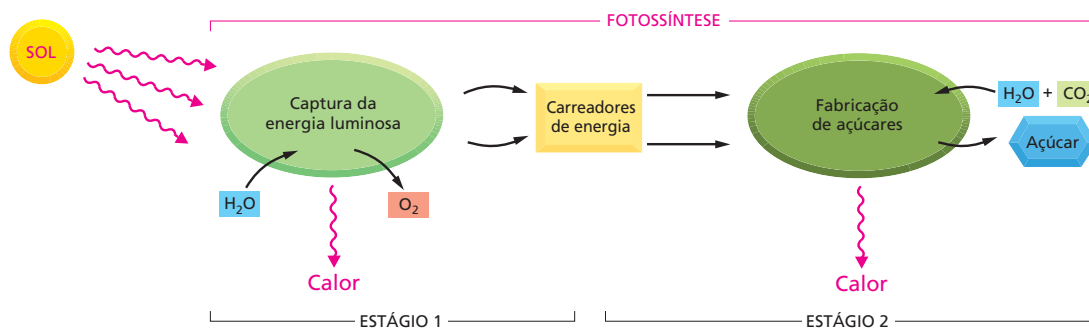
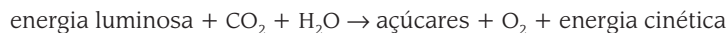



Figura 3-8 A fotossíntese ocorre em dois estágios, o primeiro é dependente de luz, e o segundo, não. Os carreadores de energia formados no primeiro estágio são duas moléculas que serão discutidas brevemente, ATP e NADPH

toriamente como energia de ligação química em pequenas moléculas especializadas que agem como carreadores de energia nos seus grupos químicos reativos. (Essas moléculas carreadoras serão discutidas posteriormente com mais detalhes neste mesmo capítulo.) O oxigênio molecular (gás O_2) proveniente da quebra da água é liberado como produto secundário desse primeiro estágio.

No segundo estágio, as moléculas que servem como carreadoras de energia são usadas para ajudar na realização do processo de *fixação de carbono,* no qual os açúcares são produzidos a partir do gás dióxido de carbono (CO_2) e de água (H_2O). Por produzirem açúcar, essas reações, que são independentes da luz, geram uma fonte essencial de energia armazenada em ligações químicas e de materiais, tanto para a própria planta como também para os animais que venham a comê-la. Os mecanismos elegantes desses dois estágios da fotossíntese são discutidos no Capítulo 14.

O resultado líquido dos dois estágios da fotossíntese, no que se refere às plantas verdes, pode ser resumido simplesmente na equação

$$\text{energia luminosa} + CO_2 + H_2O \rightarrow \text{açúcares} + O_2 + \text{energia cinética}$$

Os açúcares produzidos são então utilizados como fonte de energia de ligação química e como fonte de materiais para a produção das várias outras moléculas orgânicas, pequenas e grandes, que são essenciais para a célula vegetal.

QUESTÃO 3-1

Considerando a equação

$\text{energia luminosa} + CO_2 + H_2O \rightarrow \text{açúcares} + O_2 + \text{energia cinética}$

Espera-se que essa reação ocorra em uma única etapa? Por que a reação deve gerar calor?

Explique as respostas.

As células obtêm energia pela oxidação de moléculas orgânicas

Todas as células animais e vegetais são mantidas pela energia armazenada nas ligações químicas de moléculas orgânicas, independentemente de serem açúcares sintetizados pela fotossíntese das plantas para nutrirem a si mesmas ou se forem da mistura de moléculas, grandes ou pequenas, comidas pelos animais. Para que essa energia seja usada para viverem, crescerem e se reproduzirem, os organismos devem extraí-la de uma forma utilizável. Tanto nas plantas como nos animais, a energia é retirada das moléculas dos alimentos por um processo de *oxidação* gradual ou queima controlada

A atmosfera terrestre é formada por 21% de oxigênio, e na presença de oxigênio a forma energicamente mais estável do carbono é o CO_2, e a do hidrogênio é a H_2O. Uma célula, portanto, é capaz de obter energia a partir dos açúcares ou de outras moléculas orgânicas porque possibilita que os átomos de carbono e de hidrogênio dessas moléculas se combinem com o oxigênio – isto é, tornem-se *oxidadas* –, produzindo CO_2 e H_2O, respectivamente, processo este conhecido como **respiração** celular

A fotossíntese e a respiração são processos complementares (Figura 3-9). Isso significa que as interações entre plantas e animais não têm uma única direção. As plantas, os animais e os microrganismos convivem neste planeta já por tanto tempo que muitos deles se tornaram parte essencial do ambiente do outro. O oxigênio liberado pela fotossíntese é consumido na combustão de moléculas orgânicas por praticamente todos os organismos. Parte das moléculas de CO_2 que hoje é fixada nas moléculas orgânicas em uma folha ver-

Figura 3-9 A fotossíntese e a respiração celular são processos que se complementam no mundo vivo. O lado *esquerdo* do diagrama mostra como a fotossíntese, que ocorre nas plantas e nos microrganismos fotossintéticos, utilizam a energia da luz do sol para produzir açúcares e outras moléculas orgânicas a partir dos átomos de carbono do CO_2 da atmosfera. Esses organismos, por sua vez, servem de alimento para outros organismos. O lado *direito* do diagrama mostra como a respiração celular desses organismos utiliza o O_2 para oxidar as moléculas de alimento, liberando os mesmos átomos de carbono na forma de CO_2 de volta para a atmosfera. Nesse processo, os organismos obtêm a energia de ligação química de que eles precisam para sobreviver. Pensa-se que as primeiras células que apareceram na Terra não eram capazes nem de fazer fotossíntese, nem de respirarem (discutido no Capítulo 14). Entretanto, a fotossíntese deve ter precedido a respiração na Terra graças às fortes evidências de que seriam necessários bilhões de anos de fotossíntese antes de que fosse liberada uma quantidade de O_2 suficiente para criar uma atmosfera rica nesse gás que suportasse a respiração.

de por meio da fotossíntese, ontem pode ter sido liberada na atmosfera pela respiração de um animal ou por um fungo ou bactéria que estivesse decompondo matéria orgânica morta, ou mesmo pela respiração da própria planta. Dessa forma, vê-se que a utilização do carbono forma um ciclo enorme que envolve a *biosfera* (todos os seres vivos da Terra) como um todo, transpondo as fronteiras entre os indivíduos (**Figura 3-10**). De maneira similar, os átomos de nitrogênio, de fósforo e de enxofre transitam entre os mundos dos seres vivos e não vivos em ciclos que envolvem plantas, animais, fungos e bactérias. Estima-se que os procariotos contenham praticamente a metade do carbono armazenado nos organismos vivos. Eles são o maior reservatório individual de nitrogênio e fósforo da Terra, contendo 10 vezes mais desses nutrientes do que as plantas.

A oxidação e a redução envolvem transferência de elétrons

As células não oxidam as moléculas orgânicas em uma única etapa, como acontece quando uma molécula orgânica é queimada no fogo. Com o uso de catalisadores enzimáticos, o metabolismo processa as moléculas por meio de um grande número de reações que apenas raramente envolvem a adição direta de oxigênio. Antes de ver algumas dessas reações e as finalidades a que se destinam, é necessário explicar o que se entende por processo de oxidação.

Literalmente, o termo **oxidação** significa adição de átomos de oxigênio a uma molécula. De uma maneira mais geral, entretanto, diz-se que ocorre oxidação em qualquer reação na qual há transferência de elétrons de um átomo a outro. Oxidação, nesse sentido, refere-se à remoção de elétrons. A reação oposta, denominada **redução**, envolve a adição de elétrons. Assim, o Fe^{2+} é oxidado quando perde um elétron (tornando-se Fe^{3+}), e o átomo de cloro é reduzido se ganhar um elétron, tornando-se Cl^-. Uma vez que, em uma reação química o número de elétrons é conservado (sem perda ou ganho líquido), oxidação e redução sempre ocorrem simultaneamente, isto é, se uma molécula ganha um elétron na reação (redução), uma segunda molécula deverá perder um elétron (oxidação). Quando uma molécula de açúcar é oxidada até CO_2 e H_2O, por exem-

Figura 3-10 Os átomos de carbono são reciclados continuamente na biosfera. Os átomos de carbono são incorporados nas moléculas orgânicas do mundo vivo por meio da atividade fotossintética das plantas, das algas e das bactérias. Eles passam pelos animais, pelos microrganismos e pelos materiais orgânicos do solo e dos oceanos em ciclos sucessivos. Quando as moléculas orgânicas são oxidadas pelas células ou queimadas pelo homem como combustíveis fósseis, o CO_2 é reposto na atmosfera.

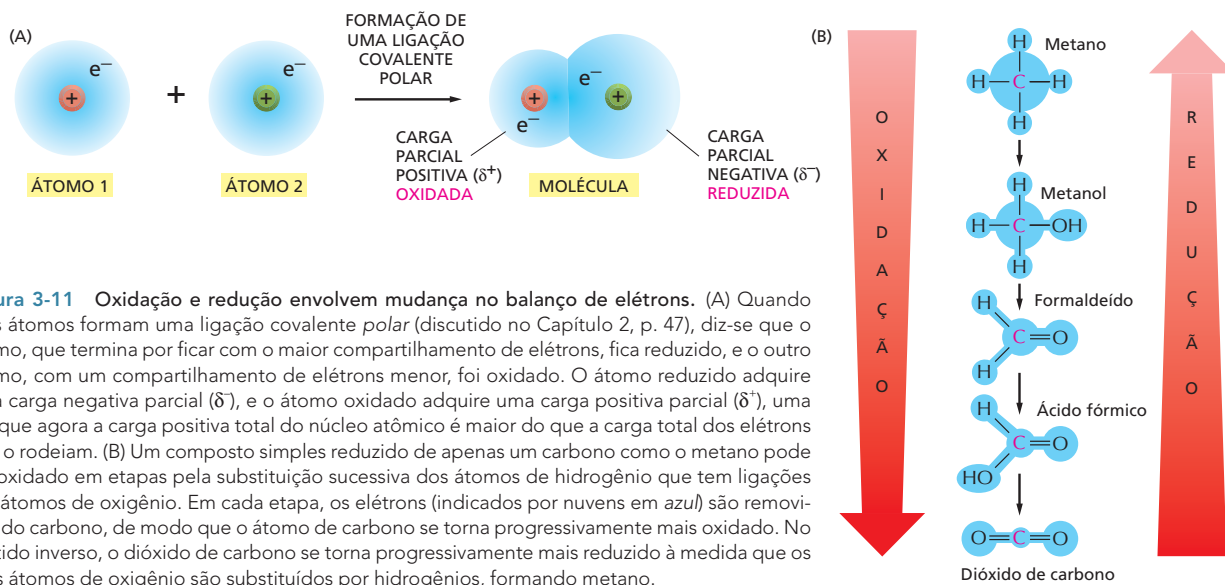
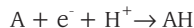



Figura 3-11 Oxidação e redução envolvem mudança no balanço de elétrons. (A) Quando dois átomos formam uma ligação covalente *polar* (discutido no Capítulo 2, p. 47), diz-se que o átomo, que termina por ficar com o maior compartilhamento de elétrons, fica reduzido, e o outro átomo, com um compartilhamento de elétrons menor, foi oxidado. O átomo reduzido adquire uma carga negativa parcial (δ^-), e o átomo oxidado adquire uma carga positiva parcial (δ^+), uma vez que agora a carga positiva total do núcleo atômico é maior do que a carga total dos elétrons que o rodeiam. (B) Um composto simples reduzido de apenas um carbono como o metano pode ser oxidado em etapas pela substituição sucessiva dos átomos de hidrogênio que tem ligações por átomos de oxigênio. Em cada etapa, os elétrons (indicados por nuvens em *azul*) são removidos do carbono, de modo que o átomo de carbono se torna progressivamente mais oxidado. No sentido inverso, o dióxido de carbono se torna progressivamente mais reduzido à medida que os seus átomos de oxigênio são substituídos por hidrogênios, formando metano.

plo, a molécula de O_2 envolvida na formação de H_2O ganha elétrons, e assim se diz que ela foi reduzida.

Os termos "oxidação" e "redução" são aplicados mesmo quando ocorre apenas troca parcial de elétrons entre átomos ligados por ligação covalente. Quando um átomo de carbono se liga covalentemente a átomos com maior afinidade por elétrons (oxigênio, cloro ou enxofre, por exemplo), há mais do que um compartilhamento de elétrons equânime, e há formação de uma ligação covalente polar. A carga positiva do núcleo do carbono agora é um pouco maior do que a carga negativa dada pelos seus elétrons. Então, o átomo de carbono adquire uma carga parcialmente positiva (δ^+) e é dito oxidado. Concomitantemente, o átomo de carbono da ligação C–H tem algo mais além de elétrons compartilhados, ele adquire uma carga parcial negativa (δ^-) e é dito reduzido (**Figura 3-11A**).

Geralmente, quando uma molécula presente em uma célula ganha um elétron (e^-), ela também, ao mesmo tempo, ganha um próton (H^+) (prótons estão totalmente disponíveis na água). Nesse caso, o efeito líquido é a adição de um átomo de hidrogênio à molécula

$$A + e^- + H^+ \rightarrow AH$$

Mesmo havendo o envolvimento de um próton e de um elétron (no lugar de apenas um elétron), tais reações de *hidrogenação* são reduções, e as reações inversas, *desidrogenação,* são oxidações. Uma maneira fácil de ver quando uma molécula orgânica é oxidada ou reduzida é contar o número de ligações C–H: há redução quando o número de ligações C–H aumenta, ao passo que há oxidação quando o número de ligações C–H diminui (Figura 3-11B).

Posteriormente, será visto neste mesmo capítulo que as células utilizam enzimas para catalisarem a oxidação de moléculas orgânicas em pequenas etapas por meio de uma sequência de reações que permite coletar a energia útil.

ENERGIA LIVRE E CATÁLISE

Assim como as células, as enzimas obedecem à segunda lei da termodinâmica. Embora elas possam acelerar reações energeticamente favoráveis, aquelas que levam ao aumento da deserdem do universo, as enzimas não podem por si mesmas forçar a ocorrência de uma reação energeticamente desfavorável. As células, entretanto, fazem exatamente isso quando crescem e se dividem: elas devem construir moléculas altamente ordenadas e ricas em energia a

partir de moléculas pequenas simples, processo que necessita de suprimento de energia.

Para entender como as enzimas podem catalisar reações energeticamente desfavoráveis, mas que sustentam a vida, primeiro se examina a energética envolvida. Nesta seção, será visto como a energia livre das moléculas contribui para a sua química e o quanto a variação de energia livre (que reflete o quanto de desordem é gerado pela reação) influencia como a reação ocorre. Também será discutido como as enzimas aproveitam as diferenças entre variação de energia livre para produzir ordem biológica. No entanto, primeiro revisaremos como a **catálise** ocorre rapidamente e com grande precisão dentro das células vivas.

QUESTÃO 3-2

Em quais das seguintes reações o átomo em *preto* sofre oxidação?

A. Na → Na^+ (átomo de Na → íon Na^+)
B. Cl → Cl^- (átomo de Cl → íon Cl^-)
C. CH_3CH_2OH → CH_3COOH (etanol → aldeído acético)
D. CH_3CHO → CH_3COOH (aldeído acético → ácido acético)
E. $CH_2{=}CH_2$ → CH_3CH_3 (eteno → etano)

As enzimas diminuem as barreiras de energia que impedem que as reações químicas ocorram

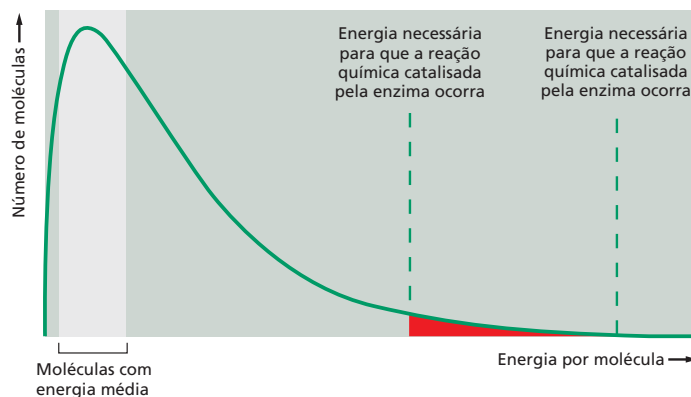
O papel queima facilmente, liberando para a atmosfera água e dióxido de carbono como gases e energia como calor:

$$\text{papel} + O_2 \rightarrow \text{fumaça} + \text{cinzas} + \text{calor} + CO_2 + H_2O$$

Entretanto, isso ocorre em apenas uma direção: nunca fumaça e cinza tomam espontaneamente dióxido de carbono e água da atmosfera aquecida reconstituindo novamente em papel. Quando o papel queima, sua energia química é dissipada como calor. Ela não é perdida pelo universo, uma vez que a energia não pode ser nem criada nem destruída. Contudo, ela se dispersa na caótica movimentação térmica das moléculas. Ao mesmo tempo, os átomos e as moléculas do papel ficam dispersos e desordenados. Na linguagem da termodinâmica, há liberação de *energia livre,* isto é, de energia que pode ser aproveitada para fazer trabalho ou para fazer ligações químicas. Essa liberação reflete a perda da organização com que energia e moléculas estavam armazenadas no papel. Mais adiante, a energia livre será discutida brevemente. Entretanto, o princípio geral pode ser resumido da seguinte forma: as reações químicas ocorrem apenas na direção que leva a uma diminuição de energia livre. Em outras palavras, a direção espontânea de qualquer reação é a direção que leva "morro abaixo". Nesse sentido, uma reação "morro abaixo" é classificada como energicamente favorável.

Embora, sob condições normais, a forma energicamente mais favorável do carbono seja como CO_2, e a do hidrogênio, como H_2O, os organismos vivos não se desfazem subitamente em uma baforada de fumaça, e também este livro não queima repentinamente em chamas nas mãos do leitor. Isso se deve ao fato de que as moléculas, tanto as dos seres vivos como as do livro, estão em estados relativamente estáveis, e elas não podem passar para um estado de menor energia, a menos que recebam certa dose de energia. Em outras palavras, as moléculas necessitam de ajuda para ultrapassar uma barreira energética antes de sofrer uma reação química que as leve a um estado de menor energia (mais favorável) (**Figura 3-12A**). Essa ajuda é conhecida como **energia de ativação**. No caso da

Figura 3-12 Mesmo as reações energicamente favoráveis precisam de energia de ativação para terem início. (A) O composto Y (reagente) está em um estado relativamente estável, e há necessidade de energia para convertê-lo no composto X (produto), mesmo que X esteja em um menor estado energético geral do que X. Essa conversão não ocorrerá a menos que o composto X adquira energia de ativação suficiente *(energia* **a** *menos energia* **b**) da sua vizinhança para que ocorra a reação que o converterá em X. Essa energia pode ser suprida por meio de uma colisão com outras moléculas que seja energicamente incomuns. No caso da reação inversa, X → Y, a energia de ativação será muito maior *(energia* **a** *menos energia* **c**). Essa reação, portanto, ocorrerá mais raramente. As energias de ativação são sempre positivas. A variação de energia total para a reação energicamente favorável Y → X é a *energia* **c** *menos a energia* **b**, um número negativo. (B) As barreiras energéticas de determinadas reações podem ser diminuídas por catalisadores (indicado pela linha marcada com ***d***). As enzimas são catalisadores especialmente efetivos porque elas reduzem enormemente a energia de ativação das reações que elas catalisam.

Figura 3-13 Uma diminuição na energia de ativação aumenta enormemente a probabilidade da ocorrência de uma reação. Em cada momento, as energias de cada uma das moléculas de uma população de moléculas de determinado substrato se distribui em uma faixa conforme mostrado no gráfico. Essas variações de energia decorrem de colisões com moléculas das proximidades que fazem com que as moléculas oscilem, vibrem e girem. No caso de uma molécula que participe de uma reação química, a energia da molécula deve ser maior do que a barreira da energia de ativação da reação (*linhas tracejadas*). Na maioria das reações biológicas, isso nunca acontece, a menos que haja catálise enzimática. Mesmo na catálise enzimática, apenas uma pequena fração das moléculas de substrato atinge um estado energético grande o suficiente para que as moléculas de substrato reajam (área sombreada em *vermelho*).

queima do livro, a energia de ativação é fornecida pelo calor de um palito de fósforo aceso. Para as moléculas que estão em solução aquosa no interior das células, esse impulso é obtido por colisões energéticas aleatórias que tenham um grau de energia incomumente grande, sendo que essas colisões se tornam mais violentas à medida que a temperatura aumenta.

Nas temperaturas das células vivas, esse pulo sobre a barreira energética é auxiliado em muito por uma classe especializada de proteínas, as **enzimas**. Cada enzima se liga firmemente a uma ou mais moléculas denominadas **substratos**, prendendo-as de tal maneira que reduzem em muito a energia de ativação necessária para facilitar determinada interação química que possa ocorrer entre elas (Figura 3-12B). Uma substância que diminui a energia de ativação de uma reação é denominada **catalisador**. Os catalisadores aumentam as velocidades das reações químicas porque permitem a ocorrência de uma proporção muito maior de colisões entre as moléculas das redondezas e os substratos que sobrepassam a barreira energética (ilustrado nas Figuras 3-13 e 3-14A). As enzimas estão incluídas entre os catalisadores mais conhecidos, elas aceleram reações por fatores tão grandes como 10^{14} (trilhões de vezes mais rápidos do que a velocidade com que a mesma reação ocorreria sem catálise enzimática). Assim, as enzimas possibilitam uma reação que, de outro modo, não ocorreria em temperaturas normais. A vida não poderia existir sem enzimas.

Figura 3-14 As enzimas catalisam reações por diminuírem a barreira da energia de ativação. (A) A barragem representa a energia de ativação, que é diminuída pela catálise enzimática. As *bolas verdes* representam os possíveis substratos que sofrem flutuações nos níveis de energia para mais e para menos em virtude do encontro constante com as ondas (analogia para indicar o bombardeamento térmico do substrato por moléculas de água adjacentes). Quando a barreira (energia de ativação) diminui significativamente, as bolas que estiverem em um momento energeticamente favorável descem a encosta. (B) As quatro paredes da caixa representam a energia de ativação de quatro reações químicas diferentes, todas elas energeticamente favoráveis, pois os produtos têm menor nível energético do que os substratos. Na caixa da *esquerda,* não ocorre nenhuma das reações porque mesmo as ondas mais altas não são grandes o suficiente para suplantar qualquer uma das barreiras energéticas. Na caixa da *direita,* a catálise enzimática diminui a energia de ativação apenas da reação 1. Agora, a ondulação das ondas permite a passagem de moléculas apenas sobre essa barreira energética, induzindo a reação 1 (Animação 3.1). (C) Um rio com ramificações e com um conjunto de represas *(caixas amarelas)* serve para ilustrar como uma série de reações catalisadas por enzimas determina com toda a exatidão as vias de reações que serão seguidas por cada uma das moléculas da célula, controlando especificamente qual reação será permitida em cada junção.

Figura 3-15 As enzimas convertem substratos em produtos, e elas mesmas permanecem sem modificação. Cada enzima tem um sítio ativo ao qual se ligam uma ou mais moléculas de substrato, formando um complexo enzima-substrato. A reação ocorre no sítio ativo e produz um complexo enzima-produto. O produto é então liberado, possibilitando que a enzima se ligue a uma outra molécula de substrato e repita a reação.

Ao contrário da temperatura, as enzimas também são altamente seletivas. Normalmente, cada enzima catalisa apenas uma determinada reação entre as várias reações possíveis que essa molécula de substrato possa sofrer. Dessa forma, as enzimas direcionam cada uma das inúmeras moléculas presentes em uma célula para vias de reações específicas (Figura 3-14B e C), produzindo os compostos de que a célula precisa.

O sucesso dos seres vivos é atribuído à capacidade que as células têm em produzir muitos tipos de enzimas, cada uma delas com propriedades precisamente especificadas. Cada uma tem uma forma única que contém um *sítio ativo* – um bolsão ou fenda no qual apenas um determinado substrato pode encaixar-se (**Figura 3-15**). Assim como todos os catalisadores, as moléculas de enzima permanecem inalteradas após participarem de uma reação de modo que podem funcionar novamente por muitos e muitos ciclos. No Capítulo 4, depois que a estrutura molecular das proteínas for vista em detalhe, será discutido mais aprofundadamente como as enzimas funcionam.

Variações na energia livre das reações determinam se as reações podem ocorrer

De acordo com a segunda lei da termodinâmica, uma reação química pode ocorrer apenas se ela resultar em um aumento líquido (no total) na desordem do universo (ver Figura 3-5). A desordem aumenta quando a energia útil que pode ser acoplada à realização de um trabalho é dissipada como calor. O critério para o aumento de desordem pode ser expresso mais convenientemente em termos de **energia livre**, ***G***, do sistema. O valor de G é mais interessante quando o sistema sofre alguma mudança; assim a **variação de energia livre**, denotada como **Δ*G*** (“delta G”), é o termo que mais frequentemente aparece, supondo-se que o sistema em consideração seja um conjunto de moléculas. Em virtude de como a energia livre é definida, ΔG mede o grau de desordem criado no universo quando ocorre uma reação que envolve essas moléculas. Reações *energeticamente favoráveis*, por definição, são aquelas que aumentam a desordem por diminuírem a energia livre do sistema ao qual elas pertencem. Em outras palavras, elas têm ΔG *negativo* (**Figura 3-16**).

Uma reação ocorre espontaneamente apenas se o seu ΔG for negativo. Um exemplo familiar, em escala macroscópica, de uma reação energicamente favorável com ΔG negativo é a “reação'' pela qual uma mola que esteja comprimida relaxa até um estado expandido, liberando para as proximidades, em forma de calor, a energia elástica que estava armazenada. Um exemplo em escala microscópica é a dissolução de sal em água. Paralelamente, reações *energicamente desfavoráveis,* com ΔG *positivo,* como aquelas nas quais dois aminoácidos são ligados para formar uma ligação peptídica, criam, por si mesmas, ordem no universo. Essas reações não podem ocorrer espontaneamente. Reações energeticamente favoráveis podem ocorrer apenas se estiverem acopladas a uma segunda reação que tenha um ΔG negativo grande o suficiente para que o ΔG do processo todo seja negativo (**Figura 3-17**). A vida é possível porque as enzimas podem criar ordem biológica pelo acoplamento de reações energeticamente desfavoráveis a reações energeticamente favoráveis. Esses conceitos fundamentais estão resumidos, com exemplos, no **Painel 3-1** (p. 94-95).

REAÇÃO ENERGETICAMENTE FAVORÁVEL

Y
X

A energia livre de Y é maior do que a energia livre de X. Portanto, ΔG < 0, e, durante a reação X→Y, a desordem do universo aumenta.

Essa reação ocorre espontaneamente

REAÇÃO ENERGETICAMENTE DESFAVORÁVEL

Y
X

Se a reação X→Y ocorre, ΔG deverá ser > 0 e o universo ficará mais ordenado.

Essa reação poderá ocorrer apenas se estiver acoplada a uma segunda

Figura 3-16 Reações energeticamente favoráveis têm Δ*G* negativo, e reações energeticamente desfavoráveis têm Δ*G* positivo. Reações energeticamente favoráveis são denominadas reações exergônicas porque elas provocam uma diminuição líquida de energia livre. Reações energeticamente desfavoráveis são denominadas reações endergônicas porque elas devem aproveitar energia livre do ambiente para que possam ocorrer.

A reação energeticamente desfavorável X→Y é impulsionada pela reação energeticamente favorável C→D, porque a variação de energia livre padrão do par de reações acopladas é menor do que zero.

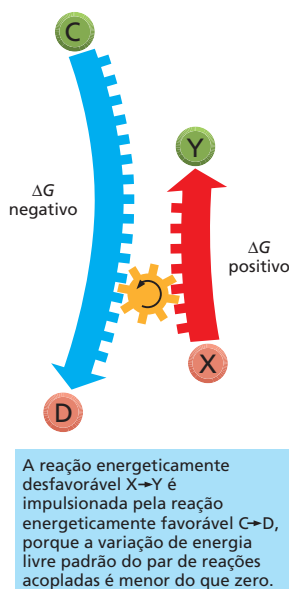



Figura 3-17 O acoplamento de reações pode impulsionar uma reação energeticamente desfavorável. A reação energeticamente desfavorável ($\Delta G > 0$) X → Y não poderá ocorrer a menos que esteja acoplada à reação energeticamente favorável ($\Delta G < 0$) C → D, de maneira tal que a variação líquida de energia livre das reações acopladas seja negativa (menos do que 0).

A concentração dos reagentes influencia a variação na energia livre e a direção da reação

Como foi recém-descrito, uma reação Y ⇋ X irá na direção Y → X quando a variação de energia livre *(ΔG)* que estiver associada à reação for negativa. Exatamente do mesmo modo que uma mola tencionada que é deixada por si própria relaxa e perde a energia que tinha armazenada para as proximidades na forma de calor. Nas reações químicas, entretanto, ΔG depende não somente da energia armazenada em cada uma das moléculas, mas também da concentração de moléculas na mistura da reação. Relembre que ΔG reflete o grau pelo qual uma reação cria mais desordem, em outras palavras, reflete o quanto a reação leva o universo a um estado mais desordenado, portanto, a um estado que é mais provável. Retomando a analogia com a moeda, é muito mais fácil que alguma das moedas mude da posição cara para coroa se o cesto de embaralhar moedas tiver 90 moedas na posição cara e apenas 10 na posição coroa. Por outro lado, esse evento será muito menos provável se o cesto tiver 10 moedas na posição cara e 90 na posição coroa.

O mesmo é verdadeiro para as reações químicas. No caso da reação reversível Y ⇋ X, quando houver grande excesso de Y em relação a X, a tendência da reação é que mais moléculas façam a transição Y → X do que X → Y. Assim, à medida que aumentar a proporção de Y em relação a X, o ΔG se tornará mais negativo na transição de Y → X (e mais positivo na transição X → Y).

A variação na energia livre padrão permite que se compare a energética de diferentes reações

Uma vez que ΔG depende das concentrações das moléculas presentes na mistura de reação a cada momento, ela não é uma medida útil para comparar as energias relativas de diferentes tipos de reações. Essas comparações são necessárias, por exemplo, para predizer se uma reação energeticamente favorável terá uma ΔG suficientemente negativa para possibilitar que ocorra uma reação energeticamente desfavorável. Para colocar tudo no mesmo nível e poder comparar, é necessário olhar a *variação de energia livre padrão* de uma reação, $\boldsymbol{\Delta G°}$. A $\Delta G°$ não depende da concentração; depende apenas das características intrínsecas das moléculas que reagem; baseia-se no comportamento dessas moléculas em condições ideais onde a concentração de cada um dos reagentes é fixada no valor de 1 mol/litro.

No caso da reação simples Y → X a 37°C, $\Delta G°$ está relacionada com ΔG da seguinte forma:

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln \frac{[X]}{[Y]}$$

onde ΔG está em quilocalorias por mol, [Y] e [X] são as concentrações de Y e X em moles/litro, ln é o logaritmo natural, R é o produto da constante dos gases, e T é a temperatura absoluta. A 37°C, $RT = 0{,}616$. (Um mol é 6×10^{23} moléculas de substância.)

Um grande volume de dados termodinâmicos foi coletado e com eles se pode calcular $\Delta G°$ para a maioria das reações metabólicas. No Painel 3-1 (p. 94-95), algumas reações comuns são comparadas quanto às suas $\Delta G°$.

As células existem em um estado de desequilíbrio químico

A partir das equações anteriores, pode ver-se que, quando as concentrações molares de Y e X forem iguais, isto é $[X]/[Y] = 1$, o valor de ΔG é igual ao valor de $\Delta G°$, porque $\ln 1 = 0$. Entretanto, a medida que a reação Y → X se processa, a concentração do produto X aumenta, e a concentração do substrato Y diminui. Essa mudança nas concentrações relativas faz com que [X]/[Y] aumente, tornando o ΔG inicialmente favorável menos e menos negativa (o logaritmo natural é positivo para um número maior do que 1 e negativo para um número menor do que 1).

QUESTÃO 3-3

Considere a analogia com a caixa de moedas que é chacoalhada, descrita na página 83. A reação de virar as moedas para cara (H) ou coroa (T) é descrita pela equação H ⇌ T, onde a velocidade da reação direta é igual à da reação inversa.

A. Quais são os valores de ΔG e de ΔG° nessa analogia?
B. O que corresponde à temperatura na qual ocorre a reação? O que corresponde à energia de ativação da reação? Suponha que se tenha uma enzima denominada "chacoalhase" catalisando a reação. Qual seria o efeito da chacoalhase e o que, mecanicamente, poderia ser a chachoalase nesta anologia?

Nesse exemplo, a formação de X é energeticamente favorável. Em outras palavras, a ΔG de Y → X é negativa, e a ΔG de X → Y é positiva. Entretanto, em razão do bombardeamento da energia cinética, sempre haverá um pouco de X sendo convertido em Y, e vice versa.

SUPONHA QUE SE INICIE COM NÚMEROS IGUAIS DE MOLÉCULAS DE Y E DE X

FINALMENTE haverá um excesso grande e suficiente de X em relação a Y para compensar exatamente a baixa velocidade X → Y. Então, o equilíbrio será atingido.

NO EQUILÍBRIO, o número de moléculas de Y que são convertidas em moléculas de Y a cada segundo será exatamente igual ao número de moléculas de X que são convertidas em moléculas de Y por segundo, de modo que não haverá mudança líquida na relação entre X e Y. No equilíbrio, a ΔG será zero.

Figura 3-18 **As reações finalmente atingirão um equilíbrio químico.** No equilíbrio, os fluxos das moléculas reagentes em ambos os sentidos serão iguais e opostos.

A reação química ocorrerá até atingir um estado de **equilíbrio**. Nesse ponto, as velocidades da reação direta e da reação inversa serão iguais, e não haverá mais mudança líquida nas concentrações do substrato ou do produto (**Figura 3-18**). Para reações no equilíbrio químico $\Delta G = 0$, isto é, a reação não ocorre nem para frente nem para trás, e nenhum trabalho poderá ser realizado. Uma vez que a manutenção de ordem dentro das células necessita de um contínuo suprimento de energia, qualquer célula cujas reações tiverem atingido o equilíbrio estará morta.

As células vivas não conseguem chegar ao estado de equilíbrio porque elas estão continuamente trocando materiais com o seu ambiente: pegando nutrientes e eliminando produtos de refugo. Muitas das reações da complexa rede metabólica das células são mantidas em desequilíbrio, porque os produtos de uma reação são continuamente usados como substratos da reação subsequente. Raramente os produtos e substratos atingem concentrações nas quais as velocidades da reação direta e da reação inversa são iguais.

A constante de equilíbrio é diretamente proporcional à $\Delta G°$

Como foi visto, no equilíbrio químico, quando as velocidades das reações direta e inversa forem iguais, a relação entre substrato e produto permanece constante. Isso permite calcular a **constante de equilíbrio**, ***K***:

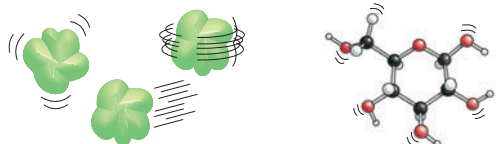
$$K = \frac{[X]}{[Y]}$$

onde [X] é a concentração do produto, e [Y] é a concentração do reagente, no equilíbrio. Essa expressão descreve a situação no ponto no qual o efeito da concentração contrabalança perfeitamente o impulso que $\Delta G°$ dá à reação, de modo que $\Delta G = 0$, e não há variação líquida na energia livre para poder levar a reação em qualquer uma das direções (ver **Painel 3-1**, p. 95).

PAINEL 3-1 Energia livre e reações biológicas

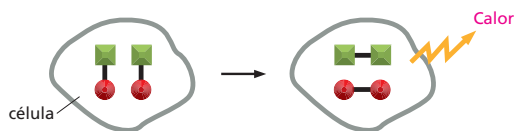
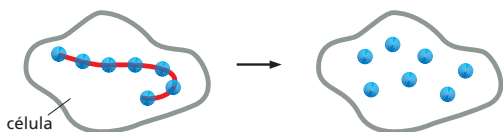
ENERGIA LIVRE

Este painel revisa os conceitos de energia livre e dá exemplos mostrando como e por que a energia livre determina a ocorrência das reações biológicas.

As moléculas das células vivas possuem energia em razão das suas vibrações, rotações, movimentos através do espaço e também em razão da energia armazenada nas ligações entre os átomos.

A **energia livre, *G*** (em kcal/mol), quantifica a energia de uma molécula que pode, em princípio, ser usada para fazer um trabalho útil em temperatura constante, como ocorre nas células vivas. A energia também pode ser expressa em joules (1 cal = 4,184 joules).

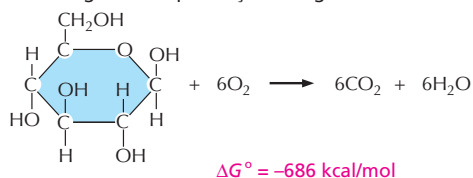
AS REAÇÕES PROVOCAM DESORDEM

Considerando uma reação química que ocorra em uma célula isolada com temperatura e volume constantes, essa reação pode produzir desordem de duas maneiras.

1. Mudanças nas energias de ligação das moléculas reagentes podem provocar liberação de calor, que desorganiza o ambiente.

2. A reação pode diminuir a quantidade de ordem nas moléculas reagentes. Por exemplo, quebrando moléculas de uma longa cadeia de moléculas ou perturbando alguma interação que evite rotação em ligações.

VELOCIDADES DE REAÇÃO

Uma reação espontânea não é, necessariamente, uma reação instantânea; reações com variação de energia livre negativa (ΔG), por si só, não ocorrem, necessariamente, com rapidez. Para a combustão de glicose na presença de oxigênio:

$$\text{glicose} + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

$$\Delta G^\circ = -686 \text{ kcal/mol}$$

Contudo, mesmo essa reação altamente favorável pode não ocorrer por séculos a menos que existam enzimas para acelerar o processo. As enzimas são capazes de catalisar reações e acelerar as velocidades de reação, mas elas não podem mudar a $\Delta G°$ da reação.

ΔG ("DELTA G")

As variações de energia livre que ocorrem nas reações são denotadas por ΔG, onde "Δ" indica diferença. Assim, para a reação,

$$A + B \longrightarrow C + D$$

ΔG = energia livre (C + D) menos energia livre (A + B)

ΔG mede a quantidade de desordem causada pela reação: a variação na ordem dentro da célula mais a variação na ordem dos arredores provocada pela liberação de calor.

ΔG é útil porque mede o quão longe do equilíbrio uma reação está. Assim, a reação

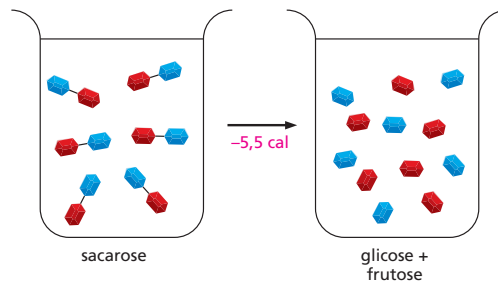
tem uma ΔG muito negativa porque a célula mantém a reação muito distante do equilíbrio ao continuamente produzir ATP fresco. Entretanto, se a célula morrer, então a maior parte do ATP será hidrolisado, até atingir o equilíbrio (as reações direta e inversa ocorrerão com velocidades iguais) e $\Delta G = 0$.

REAÇÕES ESPONTÂNEAS

Sabe-se, da segunda lei da termodinâmica, que a desordem do universo somente pode aumentar. A ΔG será *negativa* se a desordem do universo (reação mais arredores) *aumentar*.

Em outras palavras, uma reação química que ocorre espontaneamente deve ter uma ΔG negativa:

$$G_{produtos} - G_{reagentes} = \Delta G < 0$$

EXEMPLO: A diferença na energia livre de 100 mL de sacarose (açúcar comum) 10 mM e de 100 mL de glicose 10 mM mais frutose 10 mM é de cerca de –5,5 calorias. Portanto, a reação de hidrólise (sacarose → glicose + frutose) pode ocorrer espontaneamente

De maneira oposta, a reação inversa (glicose + frutose → sacarose), que tem ΔG de +5,5 calorias, não pode ocorrer sem receber energia de uma reação acoplada.

PREDIZENDO REAÇÕES

Para predizer a ocorrência de uma reação (Ocorre para a direita ou para a esquerda? Em que ponto ela cessa?), deve-se medir a mudança de energia livre padrão ($\Delta G°$) da reação.
Essa grandeza representa o ganho ou a perda de energia livre quando um mol de reagente é convertido em um mol de produto sob "condições-padrão" (todas as moléculas estão presentes na concentração de 1 M e pH 7,0).

$\Delta G°$ para algumas reações

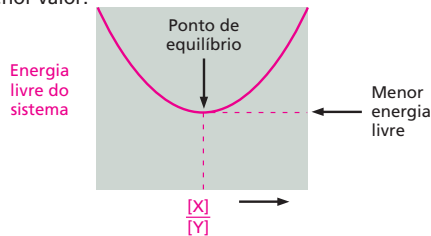
Força motora

Reação	$\Delta G°$
glicose-1-P → glicose-6-P	–1,7 kcal/mol
sacarose → glicose + frutose	–5,5 kcal/mol
ATP → ADP + P_i	–7,3 kcal/mol
glicose + $6O_2$ → $6CO_2$ + $6H_2O$	–686 kcal/mol

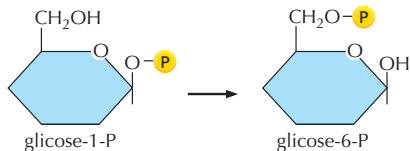
EQUILÍBRIO QUÍMICO

Existe uma relação fixa entre a mudança de energia livre padrão de uma reação, $\Delta G°$, e a constante de equilíbrio, K. Por exemplo, a reação reversível

$$Y \rightarrow X$$

ocorrerá até que as relações de concentração [X]/[Y] sejam iguais à K (observe que os colchetes [ ] indicam concentração). Nesse ponto, a energia livre do sistema terá seu menor valor.

a 37°C, $\Delta G° = -1{,}42 \log_{10} K$ (ver texto, p. 96)

$$K = 10^{-\Delta G°/1{,}42}$$

Por exemplo, a reação

tem $\Delta G° = -1{,}74$ kcal/mol. Portanto, a constante de equilíbrio é

$$K = 10^{(1{,}74/1{,}42)} = 10^{(1{,}23)} = 17$$

Então, a reação atingirá o estado de equilíbrio quando

[glicose-6-P]/[glicose-1-P] = 17

REAÇÕES ACOPLADAS

As reações podem ser "acopladas" caso elas compartilhem um ou mais intermediários. Nesse caso, a mudança de energia livre total é simplesmente a soma dos valores individuais de $\Delta G°$. Por isso, uma reação que é desfavorável (tem $\Delta G°$ positiva) pode ser impelida por uma segunda reação desde que ela seja altamente favorável.

REAÇÃO SIMPLES

$\Delta G°$ = +5, 5 kcal/mol

RESULTADO LÍQUIDO: a reação não ocorre!

REAÇÃO ACOPLADA

$\Delta G°$ = –1,8 kcal/mol

$\Delta G°$ = –7,3 kcal/mol

RESULTADO LÍQUIDO: há formação de glicose em uma reação impelida pela hidrólise de ATP.

LIGAÇÕES DE ALTA ENERGIA

Uma das reações mais comuns que ocorrem nas células é a hidrólise, na qual uma ligação covalente é rompida pela adição de água.

Muitas vezes, a $\Delta G°$ dessa reação é vagamente denominada "energia de ligação". Os compostos como acetilfosfato e ATP têm uma $\Delta G°$ de hidrólise altamente negativa e apresentam ligações de "alta energia".

Reação	$\Delta G°$ (kcal/mol)
acetil P → acetato + P_i	–10,3
ATP → ADP + P_i	–7,3
glicose-6-P → glicose + P_i	–3,3

(Observe que, para simplificar, a água foi omitida das equações acima.)

TABELA 3-1 Relação entre a variação de energia livre padrão, $\Delta G°$, e a constante de equilíbrio

Constante de equilíbrio [X]/[Y]	Energia livre de X menos energia livre de Y em kcal/mol
10^5	–7,1
10^4	–5,7
10^3	–4,3
10^2	–2,8
10	–1,4
1	0
10^{-1}	1,4
10^{-2}	2,8
10^{-3}	4,3
10^{-4}	5,7
10^{-5}	7,1

Os valores da constante de equilíbrio foram calculados para a reação química simples Y ⇌ X, usando a equação dada no texto.

O $\Delta G°$ dado aqui está em quilocalorias por mol a 37 °C. Como explicado no texto, $\Delta G°$ representa a diferença de energia livre sob condições-padrão (onde todos os componentes estão presentes a uma concentração de 1,0 mol/litro).

Dessa tabela, vê-se que, se há uma diferença de energia livre favorável de –4,3 kcal/mol para a transição Y → X, haverá 1.000 vezes mais moléculas no estado X do que no estado Y.

Assim, uma vez que

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln \frac{[X]}{[Y]}$$

(mostrado na p. 92), o equilíbrio a 37°C, onde $\Delta G = 0$ e $RT = 0{,}616$, o equilíbrio torna-se

$$\Delta G° = -0{,}616 \ln \frac{[X]}{[Y]}$$

ou

$$\Delta G° = -0{,}616 \ln K.$$

Convertendo o logaritmo natural para o logaritmo de base 10, o mais usado, obtém-se

$$\Delta G° = -1{,}42 \log K$$

Essa equação revela o quanto a relação entre Y e X no equilíbrio (expressa como constante de equilíbrio, K) depende das características intrínsecas das moléculas, expressas pelo valor de $\Delta G°$ (**Tabela 3-1**). Observe que, para cada diferença de 1,42 kcal/mol na energia livre, a 37°C, a constante de equilíbrio muda por um fator de 10 vezes. Assim, quanto mais energeticamente favorável for uma reação, mais produto será acumulado até a reação atingir o equilíbrio.

Nas reações complexas, a constante de equilíbrio depende das concentrações de todos os reagentes e produtos

Até agora se discutiu apenas reações simples, Y → X, nas quais um único substrato é convertido em produto. O que acontece, então, na situação mais complexa, na qual dois reagentes se combinam para formar um único produto, A + B ⇌ AB?

Aplicam-se os mesmos princípios, exceto que agora a constante de equilíbrio K depende das concentrações dos dois reagentes e da concentração do produto:

$$K = [AB] / [A][B]$$

As concentrações dos dois substratos se multiplicam, porque a formação do produto AB depende da colisão de A com B, e esses encontros ocorrem a uma taxa proporcional a $[A] \times [B]$. Da mesma maneira que para as reações simples, $\Delta G° = -1{,}42 \log K$, a 37°C.

A constante de equilíbrio indica a intensidade das interações moleculares

O conceito de que a variação de energia livre não se aplica apenas às reações químicas em que ligações covalentes são formadas e rompidas, mas também a interações em que uma molécula se liga a outra por meio de ligações não covalentes (ver Capítulo 2, p. 62-63). Esses tipos de interações são extremamente importantes para as células. Eles incluem as ligações de substratos a enzimas, a ligação de proteínas que regulam genes ao DNA e a ligação de uma proteína com outra, formando a miríade de complexos proteicos estruturais e funcionais que constituem uma célula viva.

Duas moléculas se ligarão entre si se $\Delta G°$ da interação for negativa. Isto é, a energia livre do complexo resultante é menor do que a soma da energia livre dos dois parceiros quando não ligados. Uma vez que a constante de equilíbrio de uma reação está diretamente relacionada com $\Delta G°$, normalmente se emprega K como medida da intensidade da interação entre duas moléculas. A intensidade da ligação é uma grandeza muito útil porque ela também indica o quão específica é a interação entre duas moléculas.

Figura 3-19 A energia de ligação das interações se reflete na constante de equilíbrio. O equilíbrio entre as moléculas A e B e o complexo AB é mantido por um balanço entre as duas reações opostas. As moléculas de A e B devem colidir para que reajam, e a taxa de associação, portanto, é proporcional ao produto das suas concentrações [A] × [B]. Como é mostrado, a razão entre as constantes de velocidades das taxas de associação (K_{ass}) e de dissociação (K_{diss}), respectivamente, é igual à constante de equilíbrio *(K)* da reação. No caso de interação entre dois componentes, *K* envolve as concentrações dos dois substratos, além da concentração do produto. Entretanto, a relação entre *K* e $\Delta G°$ é a mesma mostrada na Tabela 3-1. Quanto maior o valor de *K*, maior será a força de ligação entre A e B.

Considere a reação mostrada na **Figura 3-19**, onde a molécula A interage com a molécula B formando o complexo AB. A reação ocorre até atingir o equilíbrio, ponto no qual o número de eventos de associação é exatamente igual ao número de eventos de dissociação. Nesse ponto, as concentrações dos reagentes e do complexo AB podem ser usadas para determinar a constante de equilíbrio.

K se torna maior à medida que a *energia de ligação*, isto é, a energia liberada na interação de associação, aumenta. Em outras palavras, quanto maior for *K*, maior será a diferença de energia livre entre os estados dissociado e associado e mais firmemente as moléculas estarão ligadas. Mesmo a mudança de poucas ligações não covalentes pode ter um efeito pronunciado na interação de associação, como está ilustrado na **Figura 3-20**. Nesse exemplo, a eliminação de poucas ligações de hidrogênio que participam de uma interação pode causar uma diminuição drástica na quantidade de complexo que existe no equilíbrio.

No caso de reações em sequência, as variações de energia livre são aditivas

Agora retornamos ao assunto original: como as enzimas catalisam reações energeticamente desfavoráveis? Uma das maneiras é acoplar diretamente reações energeticamente desfavoráveis a reações energeticamente favoráveis. Considerando-se, por exemplo, duas reações

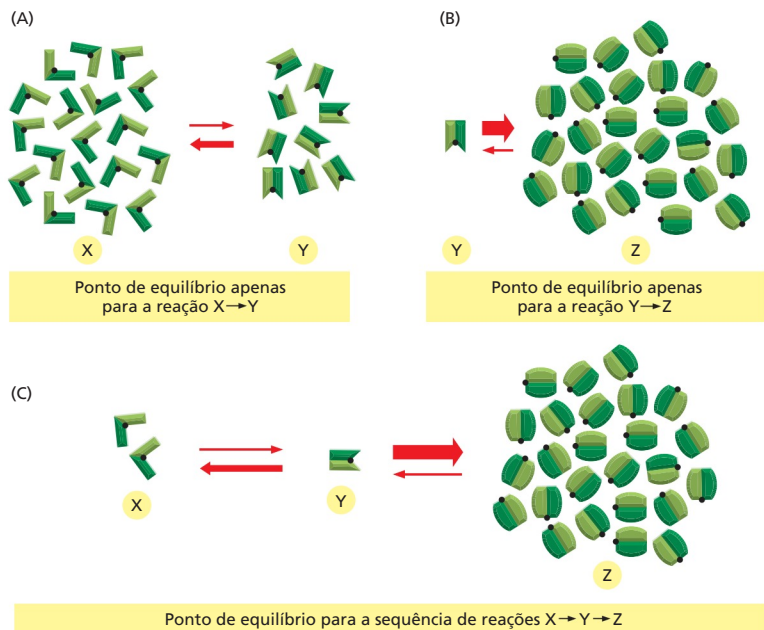
$$X \rightarrow Y \text{ e } Y \rightarrow Z$$

com valores de $\Delta G°$ de + 5 e –13 kcal/mol, respectivamente. (Relembre que um mol é 10^{23} moléculas de substância.) A reação desfavorável, X → Y, não ocorrerá espontaneamente. Entretanto, ela pode ser impelida pela reação favorável Y → Z, desde que a segunda reação venha a seguir. Isso porque a variação de energia livre total das reações acopladas é igual à soma das variações de energia livre de cada etapa individualmente. Nesse caso, a $\Delta G°$ para as reações acopladas será -8 kcal/mol, fazendo com que a via total seja energeticamente favorável.

Assim, as células podem fazer com que uma transição energicamente desfavorável (X → Y) ocorra, caso, além da enzima que catalisa a reação X → Y, haja uma segunda enzima que catalise a reação energicamente favorável, Y → Z. Realmente, a reação Y → Z atuará como se fosse um "sifão" que permite a conversão de todas as moléculas de X em moléculas Y, e então a conversão dessas últimas em moléculas Z (**Figura 3-21**). Por exemplo, várias das reações da longa via que converte os açúcares em CO_2 e H_2O são energeticamente desfavoráveis. Apesar disso, a via ocorre rapidamente até completar-se, porque a $\Delta G°$ total para toda a série de reações em sequência tem um enorme valor negativo.

Por outro lado, para muitas finalidades, a formação de uma via sequencial não é a resposta adequada para todas as necessidades metabólicas. Com fre-

Figura 3-20 Pequenas mudanças no número de ligações fracas podem ter efeitos drásticos na ligação de interação. Esse exemplo ilustra o efeito drástico da presença ou da ausência de poucas ligações não covalentes fracas dentro do contexto biológico.

Figura 3-21 Uma reação energeticamente desfavorável pode ser impulsionada por uma segunda reação que atue como um sifão químico. (A) No equilíbrio, há duas vezes mais moléculas de X do que de Y porque X tem um nível energético menor do que Y. (B) No equilíbrio, há 25 vezes mais moléculas de Z do que de Y porque Z tem um nível energético muito menor do que Y. (C) Se as reações em (A) e (B) se acoplarem, praticamente todas as moléculas de X serão convertidas em moléculas de Z, como mostrado. Em termos energéticos, a $\Delta G°$ para a reação Y → Z é tão negativa que, quando acoplada à reação X → Y, ela diminuirá a ΔG de X → Y, porque a ΔG de X → Y diminuirá à medida que a relação entre Y e X diminuir.

QUESTÃO 3-4

Para as reações mostradas na Figura 3-21, faça um esquema mostrando um diagrama da energia semelhante ao da Figura 3-12 para as duas reações isoladamente e para as duas reações combinadas. Indique a variação de energia livre padrão para as reações X → Y, Y → Z e X → Z do gráfico. Indique como as enzimas que catalisam essas reações poderiam modificar o diagrama de energia.

quência, a via desejada é apenas X → Y, sem que Y seja posteriormente convertido a outro produto. Felizmente, existem ainda outros meios de usar enzimas para acoplar reações e que envolvem a produção de moléculas carreadoras ativadas que desviam energia do sítio de uma reação para outra. Brevemente, será visto como esses sistemas funcionam. Antes disso, porém, será examinado como as enzimas encontram os seus substratos e como isso é medido.

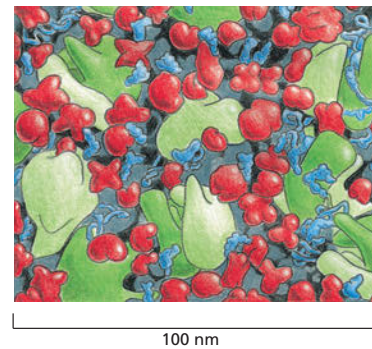
A difusão rápida permite que as enzimas encontrem seus substratos

As enzimas e os seus substratos estão presentes em um número relativamente pequeno nas células. Mesmo assim, uma enzima típica pode capturar e processar cerca de milhares de moléculas de substrato a cada segundo. Isso significa que as enzimas devem ser capazes de liberar o produto e ligar novos substratos em frações de milissegundos. Como as enzimas e os substratos se encontram tão rapidamente?

A rapidez da associação é possível porque, no nível molecular, o movimento é muito veloz. Em razão da energia cinética, as moléculas estão em constante movimento e, consequentemente, explorando com muita eficiência todo o espaço do interior da célula, vagando aleatoriamente por todo esse espaço. Esse processo é denominado **difusão**. Dessa maneira, cada uma das moléculas presentes nas células colidirá com um grande número de moléculas a cada segundo. À medida que as moléculas presentes em um líquido colidirem entre si e se empurrarem mutuamente, cada molécula se moverá primeiro em uma direção, e depois em outra, seu percurso será um *caminho aleatório* (Figura 3-22). Em um desses caminhos, a distância média que cada molécula caminha (como o voo de uma mosca varejeira) a partir de um ponto de partida é proporcional à raiz quadrada do tempo. Isto é, se uma molécula levar, em média, um segundo para andar 1 μm, ela levará 4 segundos para andar 2 μm, 100 segundos para andar 10 μm e assim por diante. Portanto, a difusão funciona bem apenas em distâncias muito curtas. Para movimentar moléculas a distâncias maiores, as células precisam contar com métodos de transporte mais ativos e diretos, processos que, inevitavelmente, necessitam de gasto de energia celular.

Figura 3-22 As moléculas atravessam as células por meio de um caminho aleatório. Em uma solução, as moléculas se movem de maneira aleatória em virtude dos constantes golpes que elas recebem pelas colisões com outras moléculas. Esse movimento permite que as moléculas pequenas se difundam rapidamente de uma parte à outra da célula (**Animação 3.2**).

O interior das células é muito congestionado (Figura 3-23). Mesmo assim, experimentos nos quais corantes fluorescentes e outras moléculas mar-

Figura 3-23 O citoplasma das células é congestionado por várias moléculas. O desenho mantém a escala aproximada. Apenas as macromoléculas são mostradas: os RNA estão em *azul*, os ribossomos em *verde*, e as proteínas em *vermelho*. As enzimas e outras macromoléculas se difundem no citoplasma com relativa lentidão em razão, em parte, do fato de interagirem com um grande número de outras macromoléculas. As moléculas pequenas, ao contrário, se difundem tão rapidamente como quando o fazem em água. (Adaptada de D.S. Goodsell, *Trends Biochem. Sci.* 16:203-206, 1991.)

cadas são injetados nas células mostram que as moléculas orgânicas pequenas se difundem através do gel aquoso do citosol praticamente tão rápido como na água. Uma molécula orgânica pequena, como um substrato, leva apenas cerca de um quinto de segundo, em média, para difundir-se a uma distância de 10 µm. A difusão é, portanto, uma maneira eficiente que as moléculas pequenas encontram para se moverem a distâncias limitadas dentro das células.

As enzimas e outras macromoléculas, entretanto, espalham-se através do citoplasma muito mais lentamente do que as moléculas pequenas. Em alguns casos, as enzimas que interagem com outras proteínas são mantidas próximas a essas proteínas por um esqueleto proteico que puxa conjuntos de proteínas para determinadas localizações no interior da célula. Mesmo que elas não estejam fisicamente sequestradas em um lugar, as enzimas se movem muito mais vagarosamente do que as pequenas moléculas. Desse modo, pode-se considerar que estejam paradas. A proporção de encontros de cada molécula de enzima com seus substratos dependerá da concentração de moléculas do substrato. Por exemplo, alguns dos substratos mais abundantes estão presentes nas células em concentrações de 0,5 mM. Uma vez que a concentração da água pura é 55 M, há, nas células, apenas uma dessas moléculas de substrato para cada 10^5 moléculas de água. Mesmo assim, o sítio ativo de uma molécula de enzima que ligue esse substrato será bombardeado com cerca de 500.000 colisões aleatórias desse substrato por segundo. Para uma concentração de substrato dez vezes menor (0,05 mM), o número de colisões diminui para 50.000 por segundo e assim por diante. Um encontro aleatório entre a superfície de uma enzima e a superfície correspondente da molécula do substrato frequentemente leva à formação imediata de um complexo enzima-substrato pronto para reagir. A reação pela qual uma ligação covalente é formada ou rompida pode agora ocorrer com extrema rapidez. Quando se percebe o quão rapidamente as moléculas se movimentam e reagem, as velocidades das reações enzimáticas não parecem tão extraordinárias.

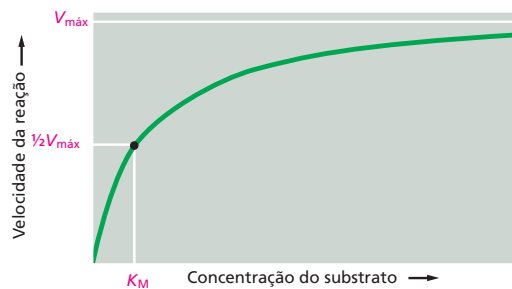
Quando a enzima e o substrato colidem e se encaixam apropriadamente pelo sítio ativo, eles formam muitas ligações fracas entre si que persistem até que a energia cinética leve a uma nova dissociação das moléculas. Essas interações fracas podem incluir ligações de hidrogênio, atrações de van der Waals e atrações eletrostáticas (como discutido no Capítulo 2). Em geral, quanto mais intensa for a ligação da enzima com seu substrato, menor será sua constante de dissociação, como foi discutido anteriormente neste mesmo capítulo. Quando duas moléculas que colidem possuem superfícies que se ajustam pobremente, são formadas poucas ligações não covalentes, e sua energia total é desprezível, em comparação com a energia cinética. Nesse caso, as duas moléculas se dissociam tão rápido como quando se juntaram (ver Figura 2-32). É isso que evita associações incorretas e indesejadas entre moléculas que não se ajustam entre si, como ocorre entre uma enzima e um substrato errado.

$V_{máx}$ e K_m medem o desempenho das enzimas

Para catalisar uma reação, a enzima, primeiro, tem de ligar-se ao seu substrato. A seguir, o substrato sofre uma reação, e há formação do produto que, inicialmente, permanece ligado à enzima. Por fim, o produto é liberado e se difunde para fora da enzima, deixando-a livre para ligar-se a outra molécula de substrato e catalisar mais uma reação (ver Figura 3-15). As velocidades dessas diferen-

QUESTÃO 3-5

A enzima anidrase carbônica é uma das enzimas mais rápidas conhecidas. Ela catalisa a conversão de CO_2 a HCO_3^- ($CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$). A rápida conversão do gás CO_2 no íon bicarbonato (HCO_3^-), muito mais solúvel, é muito importante para o transporte eficiente do CO_2 dos tecidos, onde o CO_2 é produzido pela respiração, para os pulmões, onde ele é exalado. A anidrase carbônica acelera a reação em 10^7 vezes, hidratando, na velocidade máxima, 10^5 moléculas de CO_2 por segundo. O que, você supõe, limita a velocidade dessa enzima? Faça um esquema análogo ao mostrado na Figura 3-13 para representar a aceleração de 10^7 vezes.

Figura 3-24 O desempenho das enzimas depende de quão rápido ela pode processar seus substratos. A velocidade de uma reação enzimática *(V)* aumenta à medida que a concentração do substrato aumenta até atingir um valor máximo ($V_{máx}$). Nesse ponto, todos os sítios de ligação ao substrato das moléculas de enzima estão completamente ocupados, e a velocidade da reação é limitada pela velocidade do processo catalítico que ocorre na superfície da enzima. Para a maioria das enzimas, a concentração do substrato no qual a velocidade de reação seja igual à metade da velocidade máxima (K_M) é uma medida direta do quão firme é a ligação com o substrato. Um alto valor de K_M (necessita de uma grande quantidade de substrato) corresponde a uma ligação fraca.

tes etapas variam enormemente de enzima para enzima e podem ser medidas misturando-se enzimas purificadas junto com substratos sob condições cuidadosamente definidas.

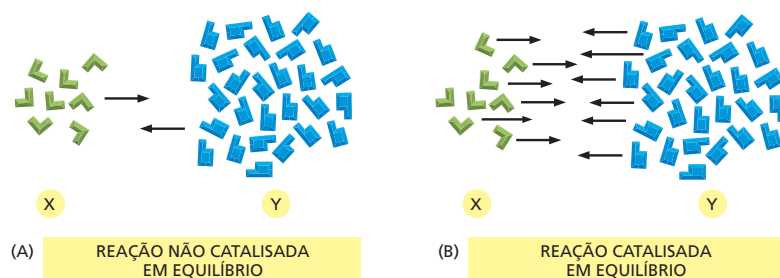
Nesses experimentos, se, a partir de um valor muito baixo, a concentração de substrato aumentar progressivamente, a concentração do complexo enzima-substrato (e, portanto, a velocidade pela qual o produto é formado) aumenta inicialmente de uma maneira linear e diretamente proporcional à concentração do substrato. Entretanto, à medida que mais e mais moléculas de enzimas se tornem ocupadas pelo substrato, esse aumento de velocidade perde a força até que, em concentrações muito altas de substrato, a velocidade atinja seu valor máximo, denominado $\boldsymbol{V_{máx}}$. Nesse ponto, os sítios ativos de todas as moléculas de enzima presentes na amostra estão totalmente ocupados por substrato, e a velocidade de formação do produto dependerá apenas de quão rápido a molécula de substrato pode ser processada. Para muitas enzimas, esse **número de renovação** é da ordem de 1.000 moléculas de substrato por segundo, embora já se tenham verificado números de renovação entre 1 e 10.000.

A concentração de substrato necessária para que a enzima trabalhe com eficiência é geralmente medida por um parâmetro diferente, a constante de Michaelis ($\boldsymbol{K_M}$), assim denominada em reconhecimento ao esforço de um dos bioquímicos que trabalharam na determinação dessa relação. A K_M de uma enzima é a concentração de substrato na qual a enzima age com velocidade igual à metade da máxima (0,5 $V_{máx}$; **Figura 3-24**). Geralmente, um valor baixo de K_M indica que o substrato se liga muito firmemente à enzima, e um valor muito grande corresponde a uma ligação fraca. Para uma discussão de como esses parâmetros são medidos e como se pode usá-los para modelar vias bioquímicas – e potencialmente planejar uma catálise melhor – veja **Como Sabemos**, p. 101-103.

É importante reconhecer que, quando uma enzima (ou outro catalisador) diminui a energia de ativação da reação Y → X, ela também diminui a energia de ativação da reação X → Y exatamente pelo mesmo valor (ver Figura 3-12). As reações direta e inversa, portanto, são aceleradas pela enzima por um mesmo fator, e o ponto de equilíbrio da reação (e, portanto, $\Delta G°$) permanece sem modificação (**Figura 3-25**).

QUESTÃO 3-6

Nas células, uma enzima catalisa a reação AB → A + B. Entretanto, ela foi isolada como uma enzima que executa a reação oposta A + B → AB. Explique esse paradoxo.

Figura 3-25 As enzimas não mudam o ponto de equilíbrio das reações. As enzimas, assim como qualquer catalisador, aceleram a velocidade das reações no sentido direto e no sentido inverso por um mesmo fator. Consequentemente, tanto para a reação (A) não catalisada quanto para a reação (B) catalisada, mostradas aqui, o número de moléculas sofrendo transição X → Y é igual ao número de moléculas que sofrem a transição Y → X, quando a relação entre o número de moléculas de Y e X for de 3,5 a 1, como está ilustrado. Em outras palavras, as duas reações atingirão o equilíbrio exatamente no mesmo ponto.

COMO SABEMOS:
USANDO A CINÉTICA PARA MODELAR E MANIPULAR VIAS METABÓLICAS

À primeira vista, parece que as vias metabólicas das células estão muito bem mapeadas com cada reação previsivelmente procedendo à seguinte, o substrato X é convertido ao produto Y, o qual passa pela enzima Z. Então, por que alguém necessita saber exatamente o quão firme uma enzima se liga ao seu substrato? Ou se ela pode processar 100 ou 1.000 moléculas de substrato por segundo?

Na realidade, tais mapas elaborados são meras sugestões de quais vias uma célula *pode* seguir à medida que ela converte nutrientes em moléculas pequenas, energia química e nos blocos de construção de vida maiores. Esses mapas não revelam com precisão como a célula se comporta sob um conjunto determinado de condições. Quais vias ela fará quando estiver em jejum, quando estiver alimentada, quando o oxigênio for escasso, quando estiver estressada ou quando decidir se dividir. O estudo da *cinética* enzimática – o quão rápido a enzima opera, como manipula seus substratos, como sua atividade é controlada – permite prever como uma determinada catálise será executada e como ela interagirá com outras enzimas da rede. Esse conhecimento leva a um conhecimento profundo da biologia celular e abre as portas para o entendimento de como proceder para que as enzimas executem as reações que se deseja.

Velocidade

A primeira etapa para entender como uma enzima opera envolve a determinação da velocidade máxima, $V_{máx}$, da reação que ela catalisa. Isso é obtido pela medição, em tubo de ensaio, de quão rápido ocorre a reação na presença de diferentes concentrações de substrato. A velocidade aumenta à medida que a concentração do substrato atinge a $V_{máx}$. A velocidade da reação é medida pelo monitoramento da rapidez com que o substrato é consumido ou com que o produto se acumula. Em muitos casos, o aparecimento do produto ou o desaparecimento do substrato pode ser observado diretamente com um espectrofotômetro. Esse instrumento detecta a presença de moléculas que absorvem luz em determinados comprimentos de onda. A NADH, por exemplo, absorve luz em 340 nm, ao passo que, na forma oxidada (NAD^+), não absorve. Assim, uma reação que gere NADH (pela redução de NAD^+) pode ser monitorada seguindo-se a formação de NADH em um espectrofotômetro.

Para determinar a $V_{máx}$ de uma reação, prepara-se uma série de tubos de ensaio, cada um contendo uma diferente concentração do substrato. Em cada tubo, adiciona-se a mesma quantidade de enzima e mede-se então a velocidade das reações – o número de micromoles de substrato consumido ou de produto gerado por minuto. Uma vez que esses números tendem a diminuir com o tempo, a velocidade que deve ser usada é a velocidade medida no início da reação. Esses valores de velocidades iniciais *(v)* são, então, colocados em um gráfico, contra a concentração de substrato, e produzem uma curva como a que pode ser vista na **Figura 3-26**.

Olhando-se esse gráfico, entretanto, é difícil determinar o valor exato da $V_{máx}$, porque não fica claro onde a velocidade da reação atinge o platô. Para contornar esse problema, os dados são convertidos nas suas recíprocas e colocados em um gráfico "duplo-recíproco", onde o inverso da velocidade ($1/v$) é colocado no eixo *y*, e o inverso da concentração do substrato (1/[S]) é colocado no eixo *x* (ver Figura 3-26C). Esse gráfico produz uma linha reta onde a interseção com o eixo *y* (o ponto onde a linha cruza o eixo *y)* representa $1/V_{máx}$ e a interseção com o eixo *x* corresponde a $-1/K_M$. Esses valores são, então, facilmente convertidos em $V_{máx}$ e K_M.

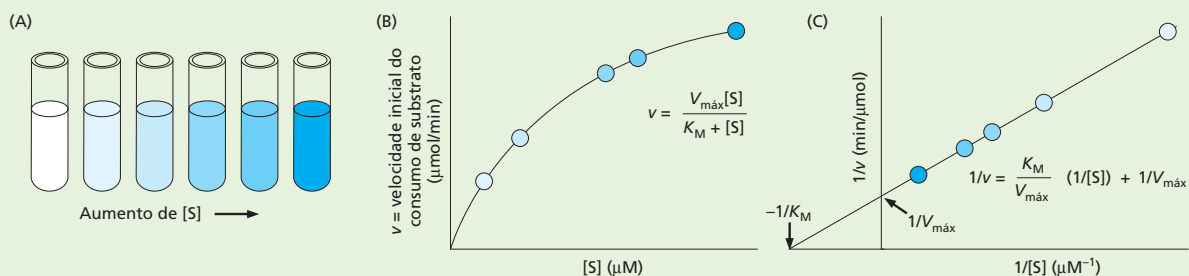



Figura 3-26 Os dados da reação são colocados em um gráfico para determinar $V_{máx}$ e K_M de uma reação catalisada por enzima. (A) Uma série de concentrações de substrato é preparada, a enzima é adicionada, e as velocidades iniciais são determinadas. (B) As velocidades iniciais (*v*) são colocadas em um gráfico contra a concentração de substrato [S] em uma curva descrita pela equação geral *y = ax/(b + x).* Substituindo-se os termos cinéticos, a equação da velocidade torna-se $v = V_{máx}[S]/(K_m + [S])$, onde $V_{máx}$ é a assíntota da curva (o valor de *y* no valor infinito de *x)*, e K_M é igual a concentração do substrato quando *v* for metade da $V_{máx}$. Essa é a chamada *equação de Michaelis-Menten*, denominada em homenagem aos bioquímicos que forneceram as evidências dessas relações enzimáticas. (C) No gráfico duplo-recíproco, $1/v$ é colocado contra 1/[S]. A equação que descreve essa linha reta é $1/v = (K_m/V_{máx})(1/[S]) + {}^1/V_{máx}$ Quando 1/[S] = 0, a intercepção em *y* ($1/v$) será $1/V_{máx}$ Quando $1/v = 0$, a intercepção em (1/[S]) será $-1/K_M$. Com esses gráficos, pode-se calcular $V_{máx}$ e K_M com melhor precisão. Por convenção, usam-se letras minúsculas para variáveis (assim *v* para velocidade) e letras maiúsculas para as constantes (assim, $V_{máx}$).

Os enzimologistas usam essa técnica para determinar os parâmetros cinéticos de muitas das reações catalisadas por enzimas (embora, hoje, programas de computador façam o gráfico de forma automática, dando diretamente o valor procurado). Algumas reações, entretanto, são muito rápidas para serem monitoradas dessa maneira. Essencialmente, a ação se completa (o substrato é completamente consumido) em milésimos de segundo. No caso dessas reações, um equipamento especial deve ser usado para acompanhar o que ocorre durante os primeiros milissegundos após a enzima e o substrato se encontrarem (**Figura 3-27**).

Controle

Os substratos não são apenas moléculas que influenciam quão bem e quão rápido as enzimas atuam. Muitas enzimas também podem ser controladas por produtos, substratos alternativos, moléculas semelhantes ao substrato, inibidores, toxinas e outras moléculas pequenas que podem tanto aumentar como diminuir a atividade. Essa regulação permite que as células controlem quando e com que rapidez as várias reações ocorrem. Esse processo será considerado mais detalhadamente no Capítulo 4.

A determinação de como um inibidor diminui a atividade de uma enzima pode revelar como a via metabólica é regulada e pode sugerir maneiras pelas quais esses pontos de controle possam ser evitados, planejando cuidadosamente mutações em determinados genes.

O efeito de um inibidor sobre a atividade da enzima é monitorado da mesma maneira com que se mede a cinética enzimática. Gera-se uma curva mostrando as velocidades da reação entre a enzima e o substrato, como foi descrito, mas também se faz curvas adicionais nas quais são adicionadas moléculas do inibidor na mistura de reação.

A comparação das curvas, com e sem inibidor, também pode revelar como um determinado inibidor impede a atividade enzimática. Por exemplo, alguns inibidores se ligam ao mesmo sítio da enzima que o substrato. Esses *inibidores competitivos* bloqueiam a atividade enzimática por competirem diretamente com o substrato pela atenção da enzima. Eles se assemelham ao substrato o suficiente para se ligarem na enzima, mas têm alguma diferença na estrutura que evita serem convertidos em produto. Esse bloqueio pode ser superado pela adição de uma quantidade de substrato que seja suficiente para que a enzima encontre com mais facilidade uma molécula do substrato do que uma molécula do inibidor. A partir dos dados cinéticos, pode ver-se que um inibidor competitivo não modifica a $V_{máx}$ da reação. Em outras palavras, adicionando-se bastante substrato, a enzima encontrará preferencialmente moléculas de substrato e atingirá o seu máximo de velocidade (**Figura 3-28**).

A inibição competitiva pode ser usada para tratar pacientes com envenenamento por etilenoglicol, um ingrediente dos anticongelantes comerciais disponíveis no mercado. Embora o etilenoglicol não seja fatalmente tóxico por si só, um subproduto do seu metabolismo, o ácido oxálico, pode ser letal. Para evitar a formação de ácido oxálico, dá-se ao paciente uma grande dose (embora não intoxicante) de etanol. O etanol compete com o etilenoglicol pela ligação com a álcool desidrogenase, a primeira enzima na deformação do ácido oxálico. Como resultado, a maior parte do etilenoglicol não é metabolisada e é eliminada com segurança do organismo.

Outros tipos de inibidores podem interagir com locais da enzima que estão distantes do sítio onde o substra-

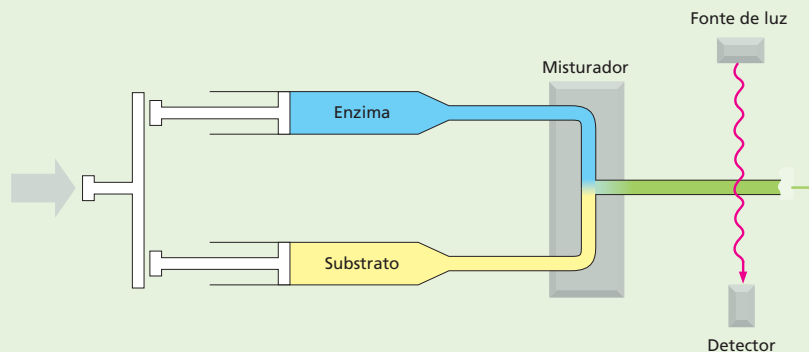



Figura 3-27 Usa-se equipamento de *stopped-flow* para se observar as reações durante os seus primeiros milissegundos. Nesse equipamento, a enzima e o substrato são rapidamente injetados em uma câmara de mistura por duas seringas. A enzima e o substrato se encontram quando se chocam no tubo de mistura com um fluxo que facilmente pode chegar a 1.000 cm/s. Eles passam então para um outro tubo e, repentinamente, atravessam um detector que monitora o aparecimento do produto. Se o detector for localizado a 1 cm do ponto em que inicialmente a enzima e o substrato se encontram, as reações podem ser observadas quando elas têm um tempo de alguns milissegundos.

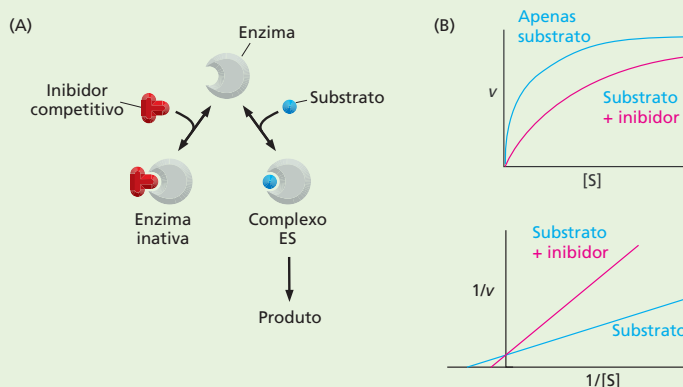



Figura 3-28 Inibidores competitivos bloqueiam diretamente a ligação do substrato. (A) O sítio ativo de uma enzima pode ligar tanto um inibidor competitivo quanto o substrato, mas não ambos simultaneamente. (B) A parte superior do gráfico mostra que a inibição por um inibidor competitivo pode ser suplantada pelo aumento da concentração do substrato. O gráfico duplo-recíproco, embaixo, mostra que a $V_{máx}$ da reação não é modificada na presença de inibidores competitivos: a interceptação em *y* é igual nas duas curvas.

to se liga. Por exemplo, agentes quelantes que reversivelmente se ligam a íons como o Mg^{2+} podem inibir enzimas que necessitem de tais metais para a atividade. Nesse caso, o substrato pode ligar-se à enzima, mas o complexo enzima-substrato não se forma tão rapidamente como quando ocorre na ausência do inibidor. Essa inibição não pode ser suplantada pela adição de mais substrato.

Planejamento

Tendo os dados cinéticos à mão, podem usar-se programas de modelagem para predizer o desempenho da enzima e ainda como a célula responderia quando exposta a diferentes condições, como a adição de um determinado açúcar ou aminoácido ao meio de cultura, ou a adição de um veneno ou agente poluente. A observação de como a célula administra seus recursos – quais vias ela favorece para responder a determinado desafio bioquímico – também pode indicar estratégias para planejar catalisadores melhores para reações de importância médica ou comercial (por exemplo, produzir medicamentos ou desintoxicar dejetos industriais). Usando-se essas táticas, bactérias foram manipuladas geneticamente para produzir índigo – o corante originalmente extraído de plantas que faz com que o *blue jeans* seja azul.

Vários programas de computador foram desenvolvidos para facilitar a dissecção de vias de reações complexas. Um desses programas necessita de informações sobre determinadas reações, como velocidades de concentrações de enzimas, substratos, produtos, inibidores e outras moléculas regulatórias. O programa prediz como as moléculas fluirão através da via metabólica, quais os produtos que serão gerados e onde os gargalos podem estar. O processo não é diferente de balancear uma equação algébrica, na qual cada átomo, carbono, nitrogênio, oxigênio e assim por diante deve ser contado adequadamente. Esse cálculo cuidadoso permite que se racionalize o planejamento das maneiras pelas quais se pode manipular a via, como redirecionando-a para contornar um gargalo, eliminando algum inibidor importante, reorientando as reações para favorecer a geração predominante de um produto ou estendendo a via para produzir uma nova molécula. Obviamente, esses modelos devem ser testados e validados em células, que poderão não seguir o comportamento esperado.

A implementação da maioria desses planos necessita do uso de técnicas de engenharia genética para colocar genes escolhidos dentro de células que possam ser manipuladas e mantidas em laboratório, geralmente bactérias. Esses métodos serão discutidos em maior profundidade no Capítulo 10. Atualmente, a associação do poder das células para propósitos comerciais (ainda que para produzir algo tão simples como um aminoácido como o triptofano) é um mercado de bilhões de dólares. À medida que mais dados sobre genomas surgem, aparecem mais enzimas para serem exploradas. Não está longe o dia em que tanques de bactérias produzidas sob medida serão processados para obter medicamentos e produtos químicos que são o equivalente biológico a ouro puro.

MOLÉCULAS CARREADORAS ATIVADAS E BIOSSÍNTESE

A energia liberada pela oxidação das moléculas dos alimentos deve ser armazenada temporariamente antes de ser canalizada para a construção tanto de moléculas orgânicas pequenas quanto dos grandes complexos moleculares necessários para as células. Em muitos casos, a energia é armazenada como energia química em um pequeno conjunto de "moléculas carreadoras", que contém uma ou mais ligações covalentes ricas em energia. Essas moléculas se difundem ligeiramente através das células e assim carregam suas ligações ricas em energia do lugar onde são geradas para os locais onde a energia é usada para a **biossíntese** e para outras atividades necessárias para as células (Figura 3-29).

Carreadores ativados armazenam energia em uma forma facilmente permutável, tanto na forma de grupos químicos prontamente transferíveis como na forma de elétrons de alta energia, tendo assim um papel duplo tanto para grupos de energia como grupos químicos para as reações fotossintéticas. A mais importante dessas moléculas carreadoras ativadas é o ATP e duas moléculas intimamente relacionadas entre si, NADH e NADPH. As células usam moléculas carreadoras ativadas da mesma forma que dinheiro para pagarem por reações que do contrário não ocorreriam.

A formação de carreadores ativados é acoplada a reações energeticamente favoráveis

Quando uma molécula de combustível como a glicose é oxidada nas células, reações catalisadas por enzimas asseguram que uma grande parte da energia livre que é liberada pela oxidação seja capturada de uma forma quimicamente útil, em vez de ser liberada inutilmente como calor. (É pela queima de açúcares que as células permitem energizar as reações metabólicas, ao passo que a queima de uma barra de chocolate na rua não o leva a nada, energeticamente falando: ela não produz energia útil metabolicamente.) Nos sistemas vivos, essa captura de energia é alcançada por meio de **reações acopladas**, nas quais uma reação energeticamente favorável é usada para fazer com que ocorra uma reação energeticamente desfavorável que produza uma molécula de carreador ativado ou alguma outra molécula útil. Os mecanismos de acoplamento necessitam de enzimas, que são fundamentais para todas as transações de energia das células.

A natureza das reações acopladas pode ser ilustrada por uma analogia mecânica (Figura 3-30), na qual uma reação química energeticamente favorável é representada por pedras que caem de um precipício. Normalmente, a energia da queda das pedras é toda gasta na forma de calor, gerado pela fricção quando as pedras atingem o solo (Figura 3-30A). Com um planejamento cuidadoso, entretanto, parte dessa energia pode ser usada para movimentar uma pá giratória que enche um balde com água (Figura 3-30B). Uma vez que agora as pedras só podem atingir o solo

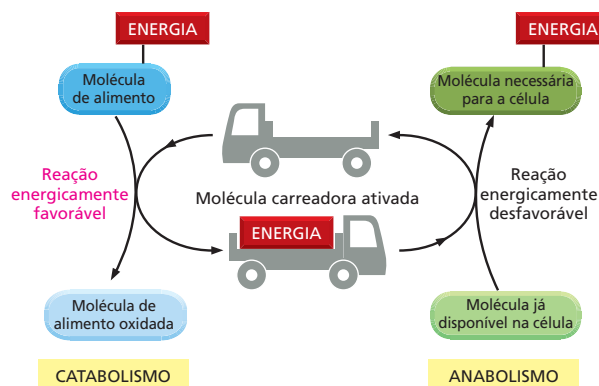



Figura 3-29 Os carreadores ativados podem armazenar e transferir a energia necessária para o metabolismo. Por servirem como transportadores de energia, as moléculas carreadoras ativadas atuam como agentes leva-e-trás que associam a degradação das moléculas de alimento e a liberação de energia (*catabolismo*) à biossíntese de moléculas orgânicas, pequenas e grandes, que requerem energia (*anabolismo*).

Energia cinética da queda das pedras é transformada apenas em energia cinética

Parte da energia cinética é usada para levantar o balde de água e uma quantidade de energia proporcionalmente menor é transformada em calor

A energia cinética potencial armazenada no balde de água levantado pode ser usada para movimentar uma máquina hidráulica que pode fazer um grande número de tarefas úteis

Figura 3-30 Modelo mecânico ilustrativo do princípio de acoplamento entre reações químicas. A reação espontânea mostrada em (A) pode servir de analogia com a oxidação direta de glicose até CO_2 e H_2O, que produz apenas calor. Em (B), a mesma reação está acoplada a uma segunda reação. Essa segunda reação pode servir como uma analogia da síntese de moléculas carreadoras ativadas. A energia que é produzida em (B) está em uma forma muito mais útil do que a produzida em (A) e pode ser usada para que ocorra uma variedade de reações que, de outra maneira, seriam energicamente desfavoráveis (C).

depois de moverem a pá giratória, diz-se que a reação energeticamente favorável da queda das pedras está diretamente acoplada à reação energeticamente desfavorável de enchimento do balde de água. Em virtude do fato de que parte da energia é usada para fazer trabalho em (B), as pedras atingem o solo com uma velocidade menor do que em (A), e, correspondentemente, menos energia é perdida como calor. A energia recuperada pode ser usada para fazer algum trabalho (Figura 3-30C).

Um processo análogo ocorre nas células, onde as enzimas fazem o papel da pá giratória da Figura 3-30B. Por meio de mecanismos que serão discutidos no Capítulo 13, as enzimas acoplam uma reação energeticamente favorável, como a oxidação dos nutrientes, a uma reação energeticamente desfavorável, como a geração de uma molécula carreadora ativada. Como resultado, a quantidade de calor liberada nas reações de oxidação é diminuída exatamente pela mesma quantidade de energia que é armazenada nas ligações covalentes ricas em energias presentes nas moléculas de carreador ativado. As moléculas de carreadores ativados, por sua vez, pegam um pacote de energia grande o suficiente para fazer reações químicas em outro local da célula.

O ATP é a molécula carreadora ativada mais amplamente usada

O mais importante e versátil dos carreadores ativados das células é o **ATP** (5′-trifosfato de adenosina). Exatamente da mesma maneira que a energia armazenada pela elevação do balde de água da Figura 3-30B pode ser usada para movimentar máquinas hidráulicas dos tipos mais variados, o ATP funciona como um depósito de energia conveniente e versátil, uma forma de moeda corrente, para possibilitar que uma grande variedade de reações químicas possa ocorrer nas células. O ATP, como é mostrado na **Figura 3-31**, é sintetizada em uma reação de *fosforilação* altamente desfavorável, na qual um grupo fosfato é adicionado ao **ADP** (5′-difosfato de adenosina). Quando necessário, o ATP doa essa porção de energia por meio de sua hidrólise, muito favorável energicamente, formando ADP e fosfato inorgânico (P_i). O ADP assim regenerado fica então disponível para ser utilizado em um novo ciclo da reação de fosforilação que forma ATP, criando um ciclo do ATP dentro das células.

A reação energeticamente favorável da hidrólise do ATP é acoplada a muitas outras reações que, sem esse acoplamento, seriam desfavoráveis por meio das quais são sintetizadas outras moléculas. Neste mesmo capítulo, serão vistas algumas dessas reações, bem como será visto como isso é feito. Muitas dessas reações de hidrólise envolvem a transferência do fosfato terminal do ATP para alguma outra molécula, como está ilustrado na **Figura 3-32**. Qualquer reação que envolva a transferência de grupos fosfato para outra molécula é denominada reação de fosforilação. Reações de fosforilação são exemplo de reações de con-

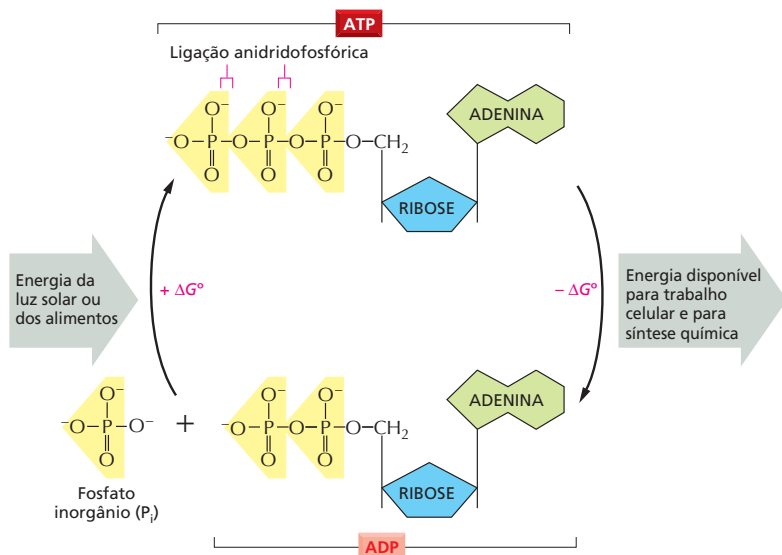
QUESTÃO 3-7

Utilize a Figura 3-30B para ilustrar a seguinte reação impelida pela hidrólise de ATP:

$$X + ATP \rightarrow ADP + P_i$$

A. Nesse caso, qual molécula ou quais moléculas seriam análogas a (i) pedras no topo do penhasco, (ii) fragmentos das pedras quebradas no fundo do penhasco, (iii) balde no seu ponto mais alto, (iv) balde no chão?
B. O que seria análogo a (i) pedras atingindo o chão na ausência da pá giratória da Figura 3-30A e (ii) à máquina hidráulica da Figura 3-30C?

Figura 3-31 A interconversão de ATP e ADP ocorre de forma cíclica. Os dois fosfatos mais externos do ATP são mantidos presos ao resto da molécula por ligações anidridofosfóricas de alta energia e podem ser transferidos com facilidade. A adição de água ao ATP pode formar ADP e fosfato inorgânico (P_i). Essa hidrólise do fosfato terminal do ATP produz entre 11 e 13 kcal/mol de energia utilizável. Embora a $\Delta G°$ dessa reação seja – 7,3 kcal/mol, a ΔG é muito mais negativa porque a relação entre ATP e seus produtos, ADP e P_i, é muito grande no interior das células.

O grande valor negativo de ΔG da reação provém de vários fatores. A liberação do grupo fosfato terminal elimina uma repulsão desfavorável entre cargas negativas que estão adjacentes. Além disso, o íon fosfato inorgânico (P_i) liberado é estabilizado por ressonância e pela formação de ligações de hidrogênio com a água. A formação de ATP a partir de ADP e P_i reverte a reação de hidrólise. Uma vez que essa reação de condensação é energicamente desfavorável, ela só poderá ocorrer se estiver acoplada a uma reação energeticamente mais favorável.

densação (ver Figura 2-25) e estão envolvidas em muitas funções celulares importantes. Elas ativam substratos, facilitam a troca de energia química e ajudam a controlar os processos de sinalização celular.

O ATP é o carreador de energia mais abundante das células. O ATP é usado, por exemplo, para suprir energia a muitas das bombas que transportam substâncias para dentro e para fora das células (discutido no Capítulo 12). O ATP também dá energia para os motores moleculares que permitem com que as células musculares se contraiam e com que as células nervosas transmitam materiais de uma das extremidades dos seus longos axônios para outros (discutido no Capítulo 17). Por que a evolução escolheu esse nucleotídeo específico entre tantos outros como o principal carreador de energia ainda permanece um mistério.

QUESTÃO 3-8

A ligação anidridofosfórica que liga dois grupos fosfato no ATP em ligação de alta energia tem $\Delta G°$ de – 7,3 kcal/mol (–30,5 kJ/mol). A hidrólise dessa ligação libera de 11 a 13 kcal/mol de energia utilizável. Como pode ser? Por que você pensa que, para $\Delta G°$, foi dada uma faixa de energia e não um número exato?

A energia armazenada no ATP é geralmente atrelada à junção de duas moléculas

Discutiu-se previamente sobre uma maneira pela qual reações energeticamente favoráveis podem ser acopladas a reações desfavoráveis, X → Y, permitindo assim que essas últimas possam ocorrer. Em um esquema desse tipo, uma segunda enzima catalisa a reação energeticamente favorável Y → Z, transformando, du-

Figura 3-32 O fosfato terminal do ATP pode ser facilmente transferido para outras moléculas. Uma vez que a ligação de alta energia da ligação anidridofosfórica do ATP é convertida em uma ligação fosfoéster de menor energia na molécula aceptora de fosfato, essa reação é energeticamente favorável e possui um valor muito negativo de ΔG. Reações de fosforilações desse tipo estão envolvidas na síntese de fosfolipídeos nas reações das etapas iniciais do catabolismo dos açúcares e em muitos outros eventos metabólicos.

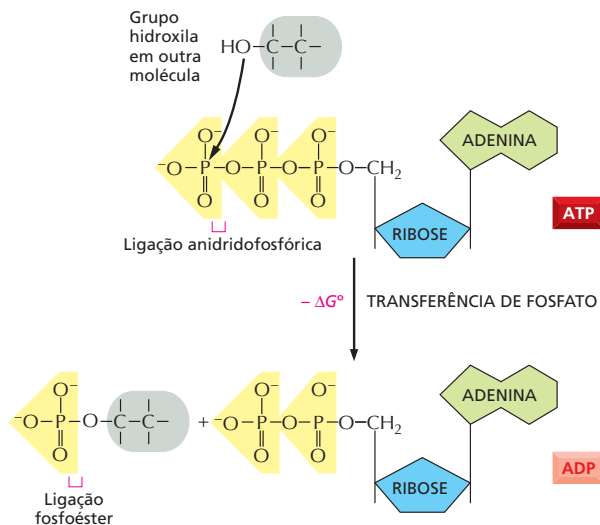
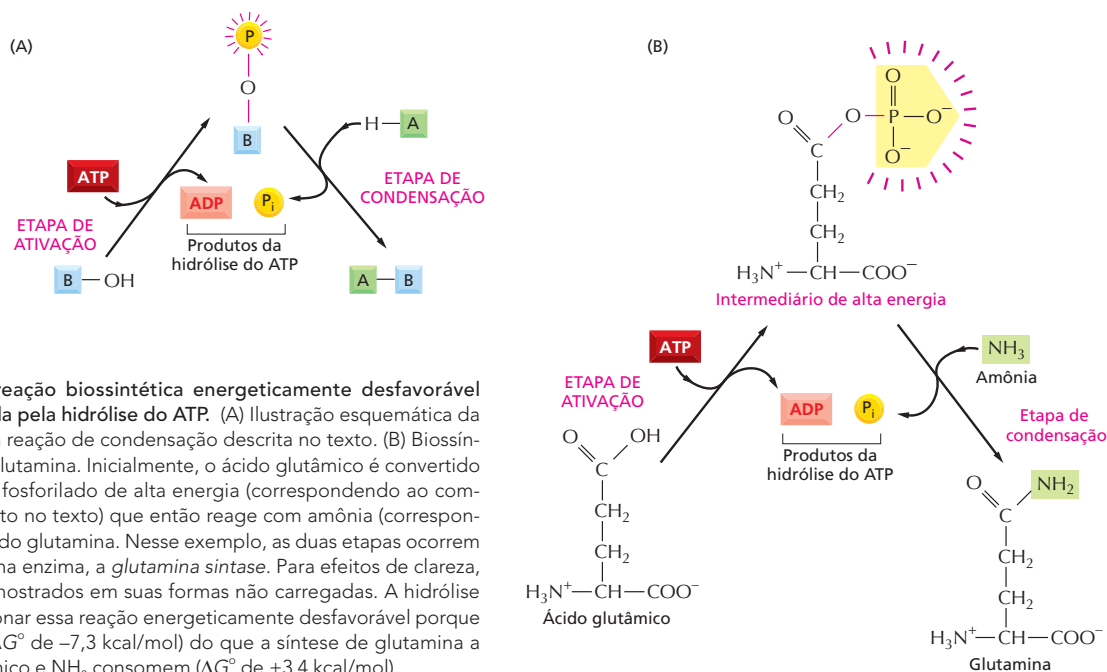
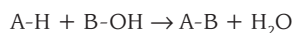



Figura 3-33 Uma reação biossintética energeticamente desfavorável pode ser impulsionada pela hidrólise do ATP. (A) Ilustração esquemática da formação de A-B pela reação de condensação descrita no texto. (B) Biossíntese do aminoácido glutamina. Inicialmente, o ácido glutâmico é convertido em um intermediário fosforilado de alta energia (correspondendo ao composto B-O-PO_3 descrito no texto) que então reage com amônia (correspondendo a A-H), formando glutamina. Nesse exemplo, as duas etapas ocorrem na superfície da mesma enzima, a *glutamina sintase*. Para efeitos de clareza, os aminoácidos são mostrados em suas formas não carregadas. A hidrólise do ATP pode impulsionar essa reação energeticamente desfavorável porque libera mais energia ($\Delta G°$ de –7,3 kcal/mol) do que a síntese de glutamina a partir de ácido glutâmico e NH_3 consomem ($\Delta G°$ de +3,4 kcal/mol).

rante o processo, todo X em Y (ver Figura 3-21). Entretanto, esse mecanismo não terá utilidade quando o produto necessário for Y e não Z.

Um tipo de reação em geral necessária para as biossínteses é aquela em que duas moléculas, A e B, são ligadas para produzir A-B em uma reação de condensação altamente desfavorável:

$$\text{A-H} + \text{B-OH} \rightarrow \text{A-B} + H_2O$$

A hidrólise do ATP pode ser acoplada diretamente a essa reação para fazer com que ela ocorra. Isto é, a energia da hidrólise do ATP é primeiramente usada para converter B-OH em um composto intermediário de alta energia que então reage diretamente com A-H, dando A-B. O mecanismo mais simples envolve a transferência de um fosfato do ATP para B-OH, produzindo B-O-PO_3. Nesse caso, a via conterá apenas duas etapas:

1. $\text{B-OH} + \text{ATP} \rightarrow \text{B-O-}PO_3 + \text{ADP}$
2. $\text{A-H} + \text{B-O-}PO_3 \rightarrow \text{A-B} + \text{Pi}$

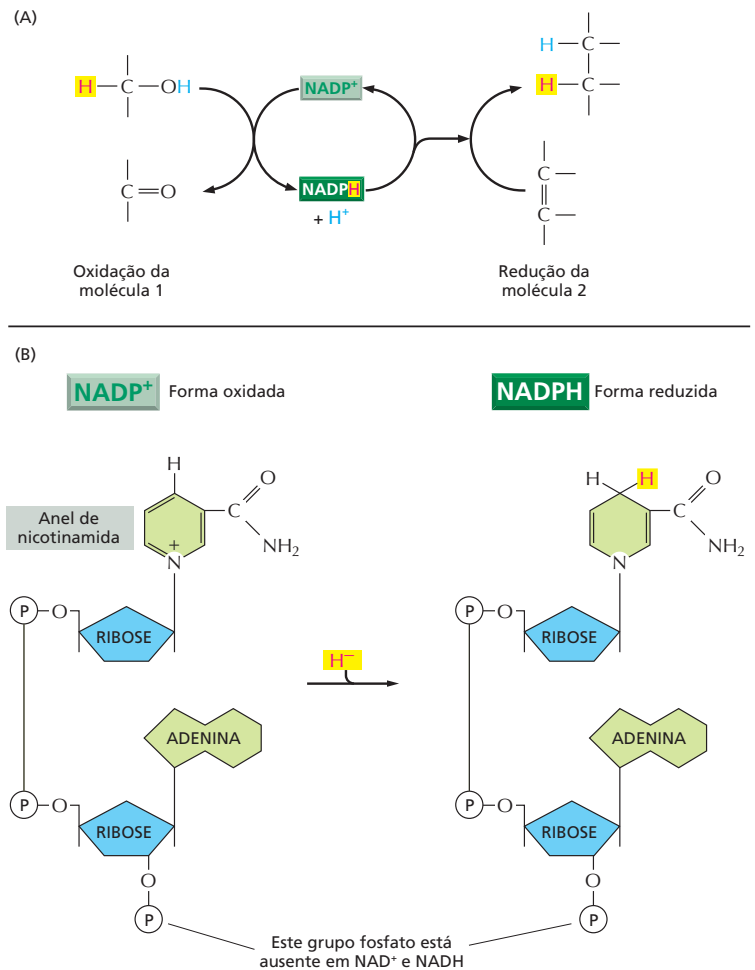
Resultado líquido: $\text{B-OH} + \text{ATP} + \text{A-H} \rightarrow \text{A-B} + \text{ADP} + P_i$

A reação de condensação, que por si mesma é energeticamente desfavorável, é forçada a ocorrer porque ela está diretamente acoplada à hidrólise do ATP em uma via de reações catalisadas por enzimas (**Figura 3-33A**).

Uma reação biossintética desse tipo é usada para sintetizar o aminoácido glutamina, como está ilustrado na Figura 3-33B. Será visto em breve que mecanismos muito similares, mas mais complexos, também são usados na produção de todas as moléculas grandes das células.

NADH e NADPH são importantes carreadoras de elétrons

Outras moléculas carreadoras ativadas importantes participam em reações de oxirredução e, em geral, também são parte de reações acopladas nas células. Esses carreadores ativados são especializados no transporte de elétrons de alta energia e átomos de hidrogênio. Os mais importantes desses carreadores de elétrons são a **NAD^+** (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e a molécula intimamente relacionada **$NADP^+$** (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato).

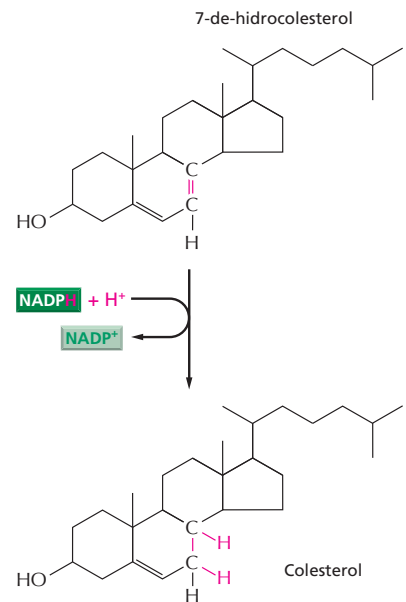
Figura 3-34 NADPH é um carreador de elétrons importante. (A) NADPH é produzida em reações do tipo geral mostrado no lado esquerdo, nas quais há remoção de dois átomos de hidrogênio de um substrato. A forma oxidada da molécula carreadora, $NADP^+$, recebe um átomo de hidrogênio e um elétron (um íon hidreto), e o próton (H^+) do outro átomo de H é liberado para a solução. Como a NADPH mantém seu íon hidreto por meio de uma ligação de alta energia, esse íon hidreto que foi adicionado pode ser facilmente transferido para outras moléculas, como é mostrado no lado direito. (B) Estrutura da $NADP^+$ e da NADPH. A parte da molécula de $NADP^+$ conhecida como anel de nicotinamida aceita dois elétrons juntamente com um próton (o equivalente a um íon hidreto, H^-), formando, assim, NADPH. As moléculas de NAD^+ e de NADH têm estrutura idêntica às da $NADP^+$ e NADPH, respectivamente, exceto quanto à ausência, nessas últimas, do grupo fosfato mostrado.

Depois, serão examinadas algumas das reações nas quais esses carreadores participam. Tanto a NAD^+ como a $NADP^+$ carregam um "pacote de energia'', correspondendo a dois elétrons de alta energia e um (H^+) e são convertidos em **NADH** (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida) e em **NADPH** (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida), respectivamente. Por isso, essas moléculas podem ser vistas como carreadoras de íons hidreto (o H^+ mais dois elétrons, ou H^-).

Assim como o ATP, a NADH é um carreador ativado que participa de muitas reações biossintéticas importantes e que, se não fosse assim, seriam energeticamente desfavoráveis. A NADPH é produzida segundo o esquema geral mostrado na Figura 3-34. Em uma série especial de reações catabólicas que produzem energia, um átomo de hidrogênio e dois elétrons são removidos da molécula de substrato e adicionados ao anel nicotínico da $NADP^+$ para formar NADPH. Essa é uma reação de oxirredução típica; o substrato é oxidado, e a $NADP^+$ é reduzida.

O íon hidreto carregado pela NADPH é prontamente doado pela reação de oxirredução subsequente, pois sem íon hidreto o anel fica com um arranjo de elétrons mais estável. Nessas reações subsequentes, que regeneram o $NADP^+$, a NADPH se torna oxidada, e o substrato fica reduzido, completando assim o ciclo da NADPH. A NADPH é um doador eficiente de íon hidreto para outras moléculas pela mesma razão pela qual a ATP transfere fosfatos com facilidade. Em ambos os casos, a transferência é acompanhada por uma grande variação negativa na energia livre. Um exemplo do uso da NADPH na biossíntese é mostrado na Figura 3-35.

Figura 3-35 NADPH participa do estágio final de uma das rotas biossintéticas que leva ao colesterol. Assim como em muitas outras reações biossintéticas, a redução da ligação C=C é feita pela transferência de um íon hidreto, proveniente da molécula de NADPH e ainda de um próton (H^+) da solução.

Essa diferença de apenas um grupo fosfato não tem efeito nas propriedades de transferência de elétrons da NADPH em relação à NADH, mas é crucial na determinação de funções específicas. O grupo fosfato extra da NADPH se localiza longe da região envolvida na transferência de elétrons (ver Figura 3-34B). Ele, entretanto, deixa a molécula de NADPH com uma forma um pouco diferente da forma da NADH, de modo que a NADPH e a NADH se ligam como substratos a grupos de enzimas diferentes. Assim, os dois tipos de carreadores são usados para transferir elétrons (ou íons hidreto) para destinos diferentes.

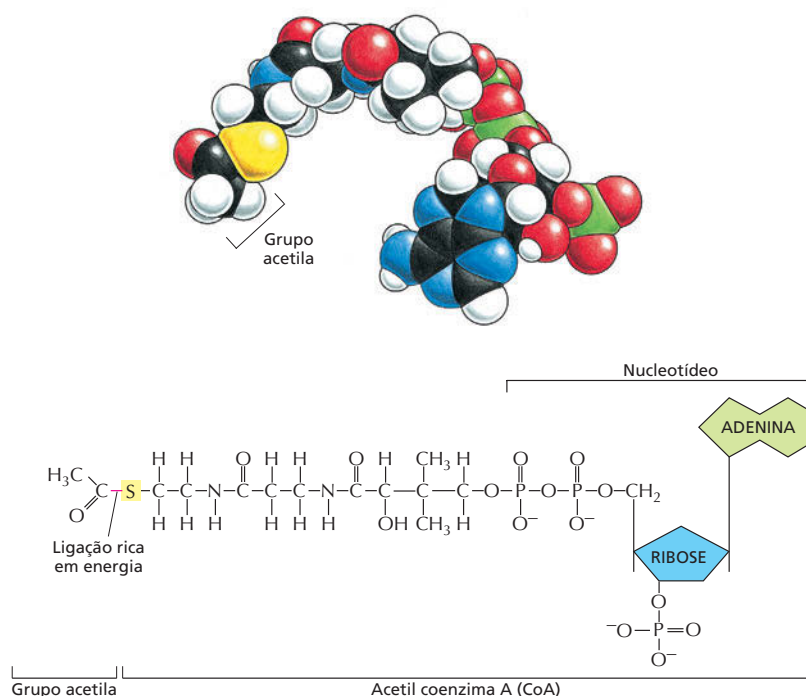
Por que existe essa divisão de trabalho? A resposta se baseia na necessidade da regulação independente de dois conjuntos de reações de transferência de elétrons. A NADPH funciona principalmente com enzimas que catalisam reações anabólicas, provendo os elétrons de alta energia que são necessários para a síntese de moléculas biológicas ricas em energia. A NADH, ao contrário, tem um papel específico como intermediário no sistema de reações catabólicas que geram ATP pela oxidação das moléculas dos alimentos, como é discutido no Capítulo 13. A geração de NADH a partir da NAD^+ e a da NADPH a partir da $NADP^+$ se dá por vias diferentes que são reguladas independentemente, de maneira que a célula pode ajustar o suprimento de elétrons para essas duas finalidades antagônicas de maneira independente. No interior das células, a proporção entre NAD^+ e NADH é mantida alta, e a relação entre $NADP^+$ e NADPH é mantida baixa. Isso mantém uma enorme disponibilidade da NAD^+ para funcionar como agente oxidante, e NADPH em abundância para agir como agente redutor, como é exigido pelas suas funções específicas no catabolismo e no anabolismo, respectivamente.

As células utilizam muitas outras moléculas carreadoras ativadas

Outros carreadores ativados também recolhem e carregam grupos químicos por meio da transferência de ligações de alta energia que ocorrem com facilidade (Tabela 3-2). Por exemplo, a $FADH_2$, assim como a NADH e NADPH, também carreiam hidrogênio e elétrons de alta energia (ver Figura 13-12). A coenzima A, por outro lado, pode carrear um grupo acetila por meio de uma ligação prontamente transferível. Essa molécula ativada é conhecida como **acetil-CoA** (acetil coenzima A), e sua estrutura está ilustrada na Figura 3-36. Na biossíntese de moléculas grandes, a acetil-CoA é utilizada para adicionar unidades de dois carbonos.

Na acetil-CoA e nas demais moléculas carreadoras mostradas na Tabela 3-2, os grupos transferíveis formam apenas uma pequena parte da molécula. O restante consiste em uma grande porção orgânica que serve como um "porta-

TABELA 3-2 Algumas moléculas carreadoras ativadas amplamente utilizadas no metabolismo

Carreadores ativados	Grupo carreador na ligação de alta energia
ATP	fosfato
NADH,NADPH, $FADH_2$	elétrons e hidrogênios
Acetil-CoA	grupo acetila
Biotina carboxilada	grupo carboxila
S-adenosilmetionina	grupo metila
Udiridina difosfato glicose	glicose

Figura 3-36 **A acetil coenzima A (CoA) é outra importante molécula carreadora ativada.** O modelo de preenchimento espacial está mostrado acima da estrutura da acetil-CoA. O átomo de enxofre *(amarelo)* forma uma ligação tioéster com o acetato. A molécula de acetato pode ser facilmente transferida para outra molécula porque a ligação tioéster é uma ligação de alta energia, pois, quando hidrolisada, ela libera uma grande quantidade de energia. Assim, o grupo acetila carregado pela CoA pode ser facilmente transferido para outras moléculas.

dor", facilitando o reconhecimento da molécula carreadora por enzimas específicas. Assim como no caso da acetil-CoA, geralmente essa porção portadora contém um nucleotídeo. Esse fato curioso talvez seja um resquício dos primórdios da evolução. Pensa-se que o principal catalisador das primeiras formas de vida na Terra, antes do DNA, foram moléculas de RNA (ou seus parentes próximos) e que as proteínas vieram mais tarde na evolução (discutido no Capítulo 7). É tentador especular se as diversas moléculas carreadoras de hoje originalmente eram encontradas neste mundo primitivo de RNA, onde suas porções nucleotídicas poderiam ter utilidade para ligá-las a enzimas de RNA.

Além das reações de transferência catalisadas pelas moléculas de ATP (transferência de grupo fosfato) e de NADPH (transferência de elétrons e hidrogênio), outras reações importantes envolvem a transferência de grupos metila, carbonila ou glicose a partir de moléculas carreadoras ativadas com finalidade de biossíntese. Em geral, os carreadores ativados utilizados são produzidos em reações nas quais há acoplamento com a hidrólise de ATP (**Figura 3-37**). Desse modo, a energia que possibilita que esses grupos possam ser usados em biossínteses, no final das contas, vem de reações catabólicas que produzem ATP. Um processo semelhante ocorre na síntese das grandes moléculas das células, os ácidos nucleicos, as proteínas e os polissacarídeos, que serão discutidos a seguir.

A síntese dos polímeros biológicos necessita de um consumo de energia

As macromoléculas são responsáveis pela maioria da massa seca das células, isto é, a massa após eliminação total da água. Essas moléculas são constituídas por *subunidades* (ou monômeros) ligadas entre si por ligações formadas durante reações de condensação catalisadas por enzimas. A reação inversa – a quebra dos polímeros – ocorre por meio de hidrólise catalisada por enzimas. Essas reações de hidrólise são energicamente favoráveis, ao passo que as reações biossintéticas necessitam consumir energia e são muito mais complexas (**Figura 3-38**).

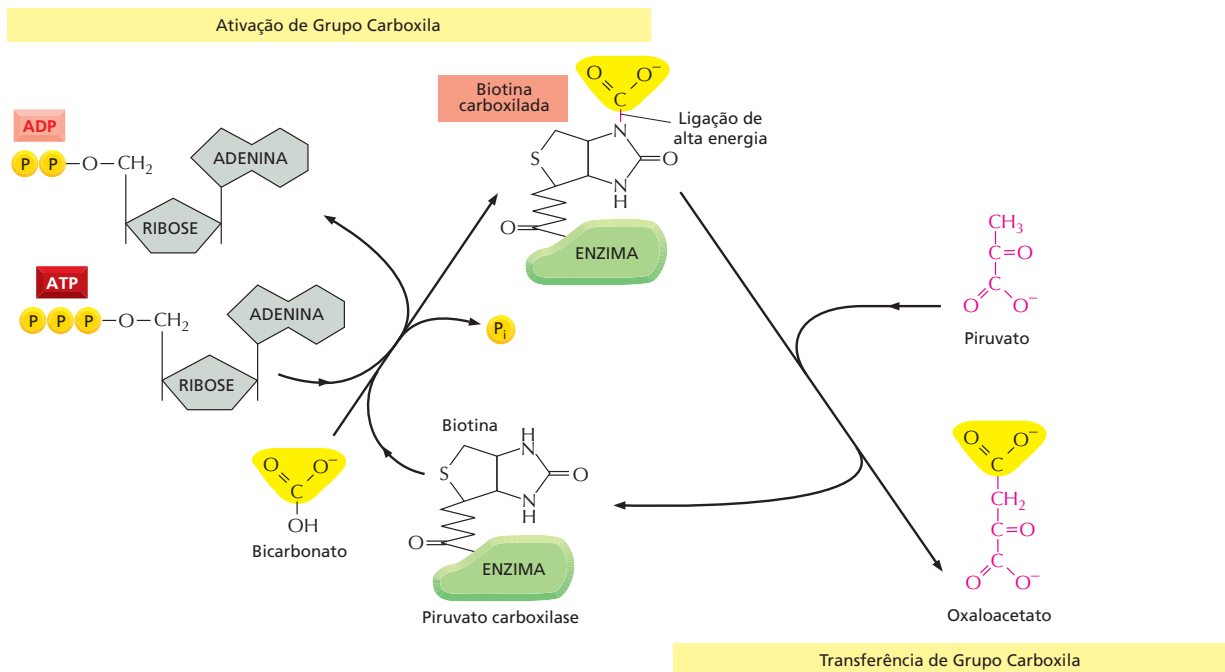



Figura 3-37 **Uma molécula carreadora ativada transfere um grupo carboxila para uma molécula de substrato.** A biotina carboxilada é usada pela enzima *piruvato carboxilase* para transferir um grupo carboxila na produção de oxaloacetato, uma das moléculas necessárias para o ciclo do ácido cítrico. A molécula aceptora nessa reação de transferência de grupo é o piruvato. Outras enzimas também usam a biotina para transferir grupos carboxila para outras moléculas aceptoras. Observar que a síntese de biotina carboxilada requer energia derivada da ATP, propriedade geral de muitos carreadores ativados.

Os ácidos nucleicos (DNA e RNA), as proteínas e os polissacarídeos são polímeros produzidos pela adição repetitiva de subunidades em uma das extremidades das cadeias em crescimento. O modo pelo qual esses três tipos de macromoléculas são sintetizados está esquematizado na **Figura 3-39**. Como está indicado na figura, a etapa de condensação de cada um dos casos depende da energia proveniente da hidrólise de um trifosfato de nucleosídeo. Exceto para o caso dos ácidos nucleicos, essas moléculas, que são o produto final, não possuem nenhum grupo. Como, então, as reações que liberam energia por hidrólise de ATP se acoplam à síntese dos polímeros?

Existe, para cada um dos tipos de macromolécula, uma via catalisada por enzimas que se assemelha àquela discutida previamente na síntese do aminoácido glutamina (ver Figura 3-33). O princípio é exatamente o mesmo, no qual o grupo OH que será removido na reação de condensação é inicialmente ativado pelo envolvimento em uma ligação rica em energia com uma segunda molécula. Entretanto, o mecanismo realmente usado para ligar a hidrólise de ATP à síntese das proteínas e de polissacarídeos é mais complexo do que o usado na síntese de glutamina. Nessas vias biosintéticas, uma série

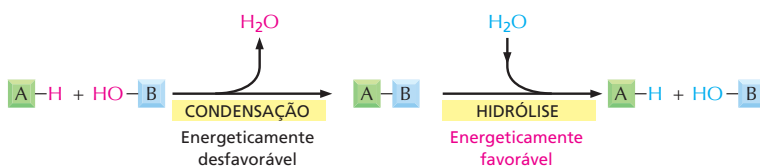



Figura 3-38 **Condensação e hidrólise são reações opostas.** As macromoléculas das células são polímeros formados por subunidades (ou monômeros) por meio de reações de condensação e são degradadas por reações de hidrólise. Todas as reações de condensação são energeticamente desaforáveis.

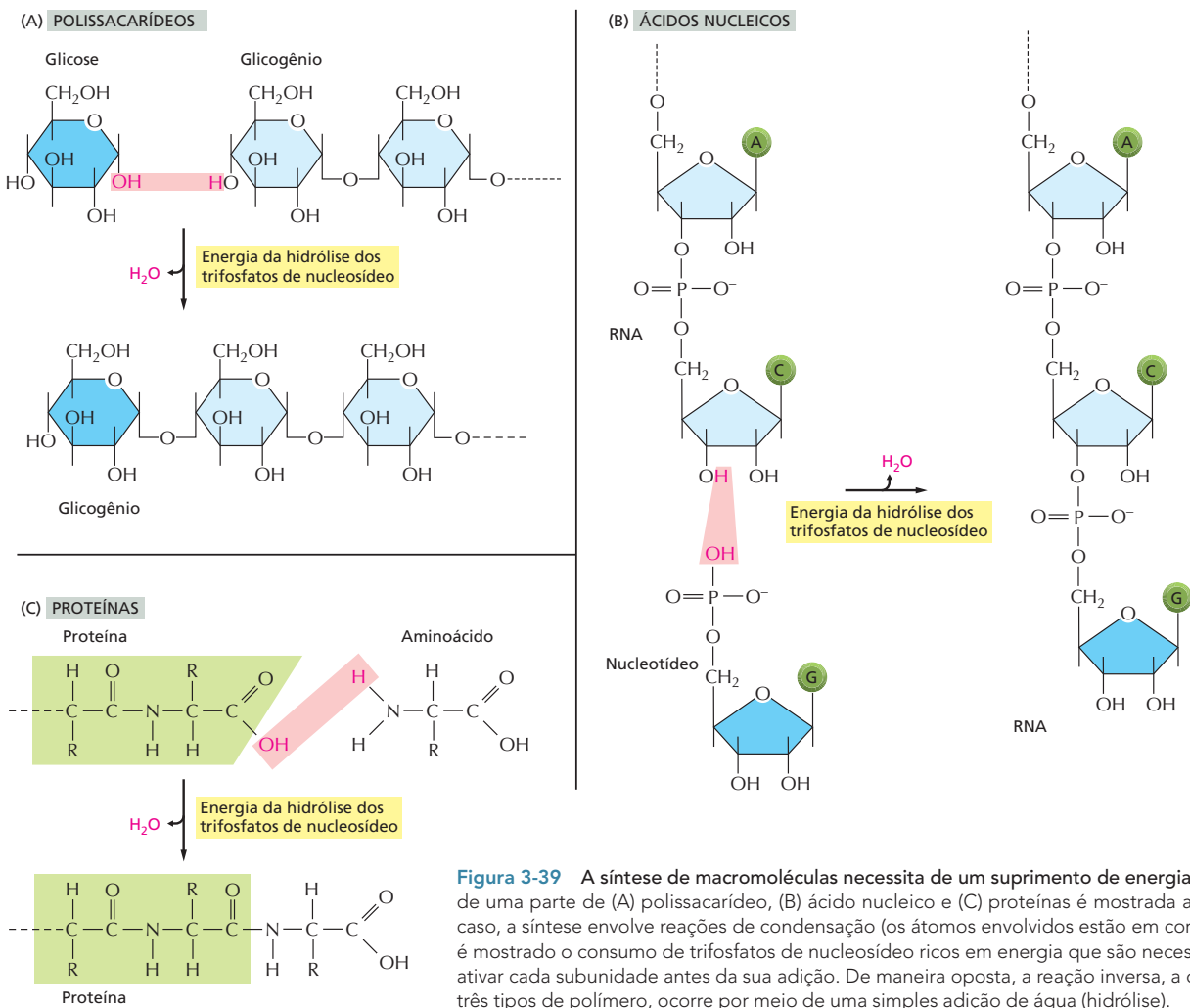



Figura 3-39 **A síntese de macromoléculas necessita de um suprimento de energia.** A síntese de uma parte de (A) polissacarídeo, (B) ácido nucleico e (C) proteínas é mostrada aqui. Nesse caso, a síntese envolve reações de condensação (os átomos envolvidos estão em cor rosa.) Não é mostrado o consumo de trifosfatos de nucleosídeo ricos em energia que são necessários para ativar cada subunidade antes da sua adição. De maneira oposta, a reação inversa, a quebra dos três tipos de polímero, ocorre por meio de uma simples adição de água (hidrólise).

QUESTÃO 3-9

Quais das reações seguintes ocorrerá apenas se estiver acoplada a uma segunda reação que seja energicamente favorável?

A. glicose + $O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$
B. $CO_2 + H_2O \rightarrow$ glicose + O_2
C. trifosfatos de nucleosídeo → DNA
D. bases de nucleotídeos → trifosfatos de nucleosídeo
E. ADP + $P_i \rightarrow$ ATP

de intermediários de alta energia gera a ligação final rica em energia que é quebrada durante a etapa de condensação (discutido no Capítulo 7 para a síntese proteica).

Existem limitações na capacidade que cada carreador ativado tem em favorecer a biossíntese. O valor de ΔG para a hidrólise de ATP à ADP e fosfato inorgânico (P_i) depende das concentrações de todos os reagentes, mas, nas concentrações geralmente encontradas nas células, ele situa-se entre –11 e –13 kcal/mol. Em princípio, essa reação de hidrólise pode ser usada para que possa ocorrer uma reação desfavorável com uma ΔG, talvez, de +10 kcal/mol, desde que existam vias de reações adequadas. No caso de algumas reações biossintéticas, entretanto, mesmo –13 kcal/mol ainda pode não ser suficiente. Nesses casos, a via de hidrólise do ATP pode ser alterada de tal maneira que primeiro produza AMP e pirofosfato (PP_i), este último, por sua vez, é então hidrolisado em uma etapa subsequente (**Figura 3-40**). Esse processo, como um todo, disponibiliza uma variação de energia livre de cerca de –26 kcal/mol. Uma reação biossintética importante que é impulsionada dessa maneira é a síntese de ácidos nucleicos (polinucleotídeos), ilustrada na **Figura 3-41**.

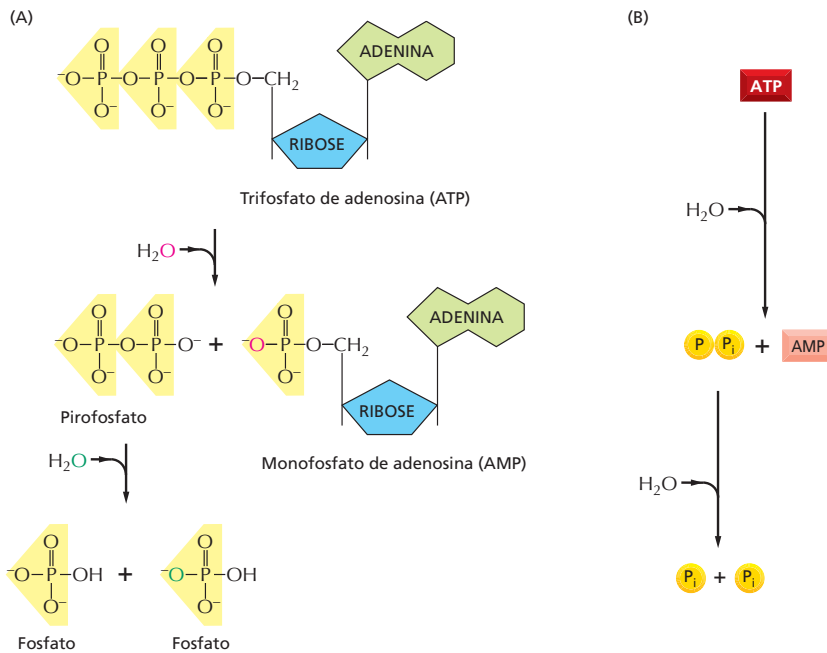



Figura 3-40 Em uma rota alternativa para a hidrólise de ATP, inicialmente há formação de pirofosfato que depois é hidrolisado. Essa rota libera cerca de duas vezes mais energia livre do que a reação mostrada anteriormente na Figura 3-31. (A) Em cada uma das duas reações de hidrólise sucessivas, cada átomo de oxigênio da molécula de água que participa da reação é retido nos produtos, e os átomos de hidrogênio da água formam íons de hidrogênio livres, H^+. (B) Reação geral mostrada de forma resumida.

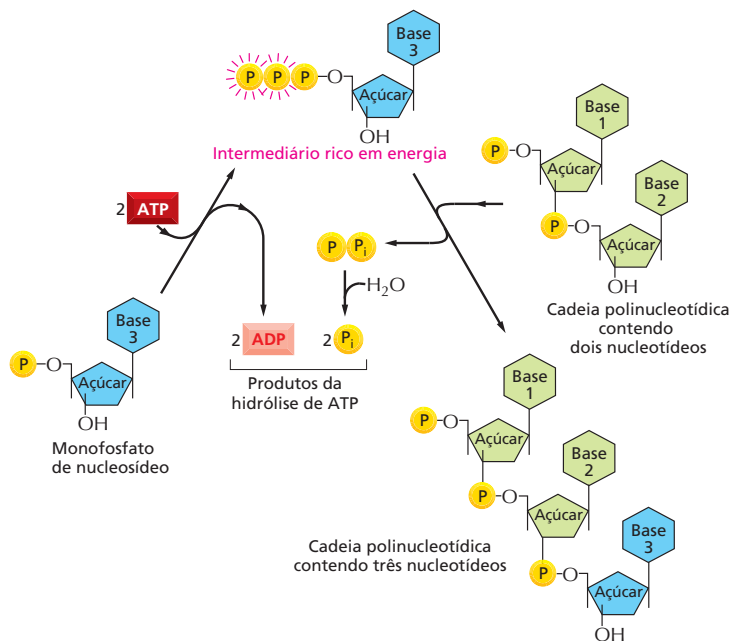



Figura 3-41 A síntese de um polinucleotídeo, RNA ou DNA, é um processo de muitas etapas movido pela hidrólise de ATP. Na primeira etapa, um monofosfato de nucleosídeo é ativado pela transferência sequencial de dois grupos fosfatos terminais de duas moléculas de ATP. O intermediário de alta energia formado, um trifosfato de nucleosídeo, existe em forma livre na solução até reagir com a extremidade da cadeia de RNA ou de DNA que está crescendo, liberando o pirofosfato. A hidrólise desse último a fosfato inorgânico é altamente favorável e contribui para fazer com que a reação como um todo siga na direção da síntese do polinucleotídeo

CONCEITOS ESSENCIAIS

- Os organismos vivos podem existir em virtude de um contínuo suprimento de energia. Parte dessa energia é usada para executar funções essenciais – reações que suportam o metabolismo celular, o crescimento e a reprodução, sendo que o restante é perdido na forma de calor.
- A fonte primária de energia da maioria dos organismos vivos é o sol. As plantas e as bactérias fotossintéticas usam a energia solar para produzir moléculas orgânicas a partir do dióxido de carbono. Os animais obtêm alimentos ao comerem plantas ou animais que se nutrem de plantas.
- Cada uma das centenas de reações químicas que ocorre nas células é catalisada especificamente por uma enzima. Um grande número de enzimas diferentes opera em sequência para formar cadeias de reações denominadas vias metabólicas, cada uma delas executando um conjunto particular de funções celulares.
- As reações catabólicas degradam as moléculas dos alimentos por vias oxidativas e liberam energia. As reações anabólicas geram as muitas moléculas complexas que as células precisam, mas necessitam de uma fonte de energia. Nas células animais, tanto as unidades necessárias para sintetisar moléculas como a energia indispensável para as necessidades das reações anabólicas são obtidos pelo catabolismo.
- As enzimas catalisam reações por se ligarem a moléculas de substrato específicas de tal maneira que diminuem a energia de ativação essencial para fazer e romper ligações covalentes específicas.
- A velocidade com que as enzimas catalisam as reações depende do quão rápido elas encontram seus substratos e do quão prontamente os produtos se formam e se difundem para fora das enzimas. Essas velocidades variam muito de uma enzima para outra e podem ser medidas misturando, sob condições definidas, enzimas purificadas junto com substratos.
- As únicas reações químicas que podem ocorrer são aquelas em que há aumento na quantidade total de desordem do universo. A variação de energia livre de uma reação ΔG mede essa desordem, que deve ser menor do que zero para que a reação ocorra espontaneamente.
- A variação de energia livre de uma reação química, ΔG, depende das concentrações das moléculas reagentes e pode ser calculada a partir dessas concentrações caso a constante de equilíbrio (K) dessa reação (ou a variação de energia livre padrão ΔG^o dos reagentes) seja conhecida.
- A constante de equilíbrio governa todas as associações (e dissociações) que ocorrem nas células entre macromoléculas e pequenas moléculas. Quanto maior for a energia de ligação entre duas moléculas, maior será a constante de equilíbrio e mais facilmente essas moléculas serão encontradas associadas entre si.
- As enzimas, por criarem vias de reações que acoplam reações favoráveis com reações desfavoráveis, fazem com que transformações químicas impossíveis de acontecerem de outra maneira realmente ocorram.
- Um conjunto pequeno de moléculas de carreadores ativados, em particular ATP, NADH e NADPH, desempenha um papel central nesses eventos de acoplamento. O ATP carreia grupos fosfato de alta energia, e o NADH e o NADPH carreiam elétrons de alta energia.
- As moléculas dos alimentos fornecem os esqueletos de carbono para a formação das grandes moléculas. As ligações covalentes dessas moléculas grandes são caracteristicamente produzidas em reações que estão acopladas a mudanças nas ligações energeticamente favoráveis de moléculas carreadoras, como o ATP e o NADPH.

TERMOS-CHAVE

acetil-CoA
carreador ativado
energia de ativação
ADP, ATP
anabolismo
biossíntese
catabolismo
catálise
catalisador
reação acoplada
difusão
entropia
enzima
equilíbrio
constante de equilíbrio, K
energia livre, G
variação de energia livre, ΔG
K_M
metabolismo
NAD^+, NADH
$NADP^+$, NADPH
oxidação
fotossíntese
redução
respiração
variação de energia livre padrão, $\Delta G°$
substrato
número de renovação
$V_{máx}$

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 3-10

Quais das seguintes afirmações estão corretas? Explique as respostas.

A. Algumas reações catalisadas por enzimas cessam completamente se as enzimas envolvidas estiverem ausentes.

B. Elétrons de alta energia (como aqueles encontrados nos carreadores de NADH e NADPH) se movem mais rápido ao redor do núcleo atômico.

C. A hidrólise de ATP para formar AMP pode fornecer praticamente o dobro da energia de hidrólise do ATP ao ADP.

D. Um átomo de carbono parcialmente oxidado tem um diâmetro menor do que o de um átomo mais reduzido.

E. Algumas moléculas carreadoras ativadas podem transferir energia e grupos químicos para uma outra molécula.

F. A regra de que oxidações liberam energia e reduções requerem fornecimento de energia se aplica a todas as reações químicas e não apenas àquelas que ocorrem nas células vivas.

G. Animais de sangue frio têm uma desvantagem energética porque eles dão menos energia ao ambiente do que os animais de sangue quente. Isso diminui suas capacidades de formarem macromoléculas ordenadas.

H. O acoplamento da reação $X \rightarrow Y$ à segunda reação, energeticamente favorável, $Y \rightarrow Z$ altera a constante de equilíbrio da primeira reação.

QUESTÃO 3-11

Considerando a transição $X \rightarrow Y$ da Figura 3-18, suponha que a única diferença entre X e Y seja a presença de três ligações de hidrogênio em Y e que estejam ausentes em X. Qual é a relação entre X e Y quando a reação está em equilíbrio? Responda aproximadamente usando a Tabela 3-1 (p. 98) e o valor de 1 kcal/mol como sendo a energia de cada ligação de hidrogênio. Como seria essa relação caso Y tenha seis ligações de hidrogênio que não existam em X?

QUESTÃO 3-12

A proteína A se liga à proteína B para formar o complexo AB. Uma célula contém, em equilíbrio, uma mistura da proteína A na concentração de 1 μM, da proteína B na concentração de 1 μM e de proteína AB (produzida quando A se liga à B) de 1 μM.

A. Tomando como referência a Figura 3-19, calcule a constante de equilíbrio para a reação $A + B \rightleftharpoons AB$.

B. Qual será a constante de equilíbrio se A, B e AB estiverem em equilíbrio e presentes, cada um, em concentrações muito menores do que 1 nM?

C. Quantas ligações de hidrogênio a mais seriam necessárias para manter A e B juntas nessa concentração baixa para que seja encontrada uma proporção similar de moléculas do complexo AB? (Relembre que cada ligação de hidrogênio contribui com cerca de 1 kcal/mol.)

QUESTÃO 3-13

Discuta a afirmação: "Independentemente de que a ΔG de uma reação seja grande, pequena ou igual à $\Delta G°$, ela depende da concentração dos compostos que participam da reação".

QUESTÃO 3-14

A. Qual é o número máximo de moléculas de ATP que pode ser gerado a partir de uma molécula de glicose, se a oxidação completa de 1 mol de glicose a CO_2 e de H_2O produz 686 kcal e a energia química útil disponível na ligação fosfato de alta energia de 1 mol de ATP é 12 kcal?

B. Como será visto no Capítulo 14 (Tabela 14-1), a respiração produz 30 mols de ATP a partir de 1 mol de glicose. Compare esse número com a resposta anterior. Qual é a eficiência total da produção de ATP a partir da glicose?

C. Se as células do seu corpo oxidarem 1 mol de glicose, de quantos graus a temperatura do seu corpo subiria (considere que o seu corpo seja constituído de 75 kg de água) se o calor não fosse dissipado para o ambiente? Relembre que uma quilocaloria (kcal) é definida como a quantidade de energia que aumenta a temperatura de 1 kg de água em 1°C.

D. Quais seriam as consequências se as células do seu corpo convertessem a energia dos alimentos com uma eficiência de apenas 20%? Seu corpo, na forma como ele é formado atualmente, estaria trabalhando perfeitamente, superaquecido ou congelado?

E. Uma pessoa em repouso hidrolisa cerca de 40 kg de ATP a cada 24 horas. Quanto de glicose precisa ser oxidado para produzir essa quantidade de energia? (Dica: examine a estrutura do ATP na Figura 2-23 para calcular o peso molecular. Os pesos atômicos do H, C, N, O e P são 1, 12, 14, 16 e 31, respectivamente.)

QUESTÃO 3-15

Um cientista proeminente afirmou ter isolado uma célula mutante que pode converter 1 molécula de glicose em 57 moléculas de ATP. Essa descoberta deve ser comemorada ou será que há algo errado? Explique a resposta.

QUESTÃO 3-16

Na simples reação A $\rightleftharpoons$ A*, uma molécula é interconvertida entre duas formas que diferem quanto à energia livre padrão em 4,3 kcal/mol, sendo que A* tem a maior ***G*°.**

A. Use a Tabela 3-1 (p. 98) para achar o número de moléculas que, no equilíbrio, estarão no estado A* em comparação com o número de moléculas que estarão no estado A.

B. Se uma enzima diminuir a energia de ativação em 2,8 kcal/mol, qual seria a mudança na relação A/A*?

QUESTÃO 3-17

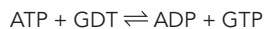
Uma reação de uma via biossintética de apenas uma etapa que converte um metabólito de um cogumelo em um veneno com alto poder de induzir vício é energicamente altamente desfavorável (metabólito $\rightleftharpoons$ veneno). A reação, normalmente, é impulsionada pela hidrólise de ATP. Considere que uma mutação na enzima que catalisa essa reação impede que ela utilize ATP, mas ainda permite que ela catalise a reação.

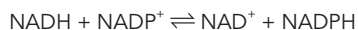
A. Seria seguro comer o cogumelo mutante? Baseie a resposta na estimativa da quantidade menor de veneno que o organismo produziria, considerando que a reação esteja em equilíbrio e que a energia armazenada no ATP seja usada para possibilitar a ocorrência da reação desfavorável.

B. A resposta seria a mesma para uma outra enzima mutante que acoplasse a reação de hidrólise de ATP, mas que fosse 100 vezes mais lenta?

QUESTÃO 3-18

Considere o efeito de duas enzimas, A e B. A enzima A catalisa a reação

$$\text{ATP} + \text{GDT} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{GTP}$$

e a enzima B catalisa a reação

$$\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$$

Discuta se as enzimas seriam benéficas ou prejudiciais para células.

QUESTÃO 3-19

Discuta a seguinte afirmação: "Enzimas e calor se assemelham porque ambos podem aumentar a velocidade de reações que, embora termodinamicamente possíveis, não ocorreriam a uma velocidade apreciáveis porque necessitam de alta energia de ativação. Doenças que são tratadas pela aplicação cuidadosa de calor, como a ingestão de canja de galinha quente, seriam provavelmente causadas por funcionamento insuficiente de uma enzima".

QUESTÃO 3-20

A curva mostrada na Figura E3-25/3-24 é descrita pela equação de Michaelis-Menten:

$$\text{velocidade} = V_{\text{máx}}+[\text{S}]/([\text{S}] + K_\text{M})$$

Você pode se convencer de que as características descritas qualitativamente no texto são perfeitamente representadas por essa equação? Especificamente, como a equação pode ser simplificada quando a concentração do substrato estiver nas seguintes faixas: (A) a concentração do substrato [S] é muito menor do que o K_M, (B) a concentração do substrato [S] igual ao K_M, (C) concentração do substrato [S] muito maior do que o K_M?

QUESTÃO 3-21

A velocidade de uma reação enzimática comum é dada pela equação de Michaelis-Mentem padrão:

$$\text{velocidade} = V_{\text{máx}} [\text{S}]/([\text{S}]+ K_\text{M})$$

Se a $V_{\text{máx}}$ da enzima for 100 µmols/s e o K_M for 1 mM, em que concentração do substrato a velocidade será 50 µmols/s? Faça um gráfico da velocidade *versus* a concentração do substrato (S) para [S] variando de 0 a 10 mM. Converta esse gráfico em um gráfico 1/velocidade *versus* 1/[S]. Por que o último gráfico é uma linha reta?

QUESTÃO 3-22

Selecione a opção correta dentre as que seguem e explique suas escolhas. Se [S] for muito menor do que K_M, o sítio ativo da enzima estará mais ocupado/desocupado. Se [S] for muito maior do que K_M, a velocidade da reação é limitada pela enzima/concentração do substrato.

QUESTÃO 3-23

A. As velocidades da reação S → P catalisada pela enzima E foram determinadas sob condições nas quais apenas pouco produto foi formado. Essas determinações deram os seguintes dados:

Substrato de concentração (µM)	Velocidade de reação (µmol/min)
0,08	0,15
0,12	0,21
0,54	0,7
1,23	1,1
1,82	1,3
2,72	1,5
4,94	1,7
10,00	1,8

Faça um gráfico com os dados acima. Use esse gráfico para estimar os valores de K_M e $V_{\text{máx}}$ da enzima.

B. Relembre de “Como Sabemos” (p. 103-105) que, para determinar esses valores com mais precisão, o truque geralmente usado é transformar na equação de Michaelis-Mentem de forma a usar os dados para fazer um gráfico que origine uma reta. Um simples rearranjo leva a

$$1/\text{velocidade} = (K_M/V_{máx})\ (1/[S] + 1/V_{máx}$$

isto é, uma equação com a forma $y = ax + b$. Calcule 1/velocidade e 1/[S] para os dados na parte (A) e então faça um novo gráfico, 1/velocidade *versus* 1/[S]. Determine K_M e $V_{máx}$ a partir da interseção da linha com o eixo, onde 1/[S] = 0, combinado com a inclinação da linha. Os resultados obtidos concordam com as estimativas feitas a partir do primeiro gráfico, feito com os dados brutos?

C. Observe a parte (A), que afirma que apenas uma quantidade muito pequena do produto foi formada nas condições de reação. Por que isso é importante?

D. Suponha que a enzima seja regulada: quando fosforilada, o K_M aumenta por um fator de 3 sem mudança na $K_{máx.}$ Isso é uma ativação ou uma inibição? Faça gráficos com o que você espera para a enzima fosforilada, tanto para o gráfico (A) como para o gráfico (B).

CAPÍTULO 4

Estrutura e Função de Proteínas

Quando observamos uma célula em um microscópio ou analisamos sua atividade bioquímica ou elétrica, estamos, em essência, observando a atividade de proteínas. As proteínas são blocos de construção dos quais as células são compostas, e elas constituem a maior parte da massa celular seca. Além de fornecerem à célula sua forma e estrutura, as proteínas também participam de quase todas as funções celulares. As **enzimas** realizam reações químicas intracelulares por meio de suas intrincadas superfícies moleculares formadas por saliências e fendas capazes de ligar ou excluir moléculas específicas. As proteínas embebidas na membrana plasmática formam canais e bombas que controlam a passagem de nutrientes e outras pequenas moléculas para o interior ou para o exterior da célula. Outras proteínas carregam mensagens de uma célula à outra ou, ainda, agem como integradoras de sinais, transmitindo informações a partir da membrana plasmática para o núcleo de células individuais. Há, também, proteínas que funcionam como pequenas máquinas moleculares com partes motoras: algumas, como a cinesina, propelem organelas pelo citoplasma, outras, como as helicases, promovem a separação da fita dupla de DNA. Proteínas especializadas também podem atuar como anticorpos, toxinas, hormônios, moléculas anticongelantes, fibras elásticas e geradores de luminescência. Antes de compreendermos como os genes funcionam, como os músculos se contraem, como as células nervosas conduzem a eletricidade, como embriões se desenvolvem ou como o nosso corpo funciona, é necessário entender as proteínas.

As diversas funções realizadas pelas proteínas (Painel 4-1, p. 120) se devem ao grande número de conformações que elas são capazes de adotar. Dessa forma, começamos a descrição dessas notáveis macromoléculas pela discussão da sua estrutura tridimensional e das propriedades que essas estruturas lhes conferem. Na sequência, verificaremos como as proteínas funcionam: como enzimas catalisam reações químicas, como algumas agem como “interruptores” moleculares e como outras geram movimentos coorde-

PAINEL 4-1 Alguns exemplos gerais de funções das proteínas

ENZIMA

Função: Catalisar a formação ou a quebra de ligações covalentes.

Exemplos: As células vivas contêm milhares de enzimas diferentes, cada uma catalisando (acelerando) uma reação específica. Exemplos incluem: *triptofano-sintetase* – sintetiza o aminoácido triptofano; *pepsina* – degrada, no estômago, as proteínas ingeridas na dieta; *ribulose-bifosfato-carboxilase* – nas plantas, atua na conversão de dióxido de carbono em açúcar; DNA-*polimerase* – copia a molécula de DNA; *proteína-cinase* – adiciona grupos fosfato a moléculas proteicas.

PROTEÍNAS ESTRUTURAIS

Função: Prover suporte mecânico para células e tecidos.

Exemplos: No meio extracelular: o *colágeno* e a *elastina* são constituintes comuns da matriz extracelular; formam fibras em tendões e ligamentos. No meio intracelular: a *tubulina* forma microtúbulos longos e rígidos; a *actina* forma filamentos que acompanham e sustentam a membrana plasmática; a α-queratina forma fibras que reforçam as células epiteliais e é a proteína predominante em cabelos e chifres.

PROTEÍNAS DE TRANSPORTE

Função: Transportar pequenas moléculas ou íons.

Exemplos: Na circulação sanguínea, a *albumina sérica* transporta lipídeos; a *hemoglobina* transporta oxigênio, e a *transferrina* transporta ferro. Muitas proteínas embebidas na membrana plasmática transportam íons ou pequenas moléculas através da membrana. Por exemplo, a proteína bacteriana *bacteriorrodopsina* é uma bomba de prótons ativada pela luz que transporta íons H^+ para fora da célula; os transportadores de *glicose transferem* glicose para dentro e para fora das células hepáticas, e a *bomba de* Ca^{2+}, nas células musculares, bombeia os íons cálcio, necessários para disparar a contração muscular, para o interior do retículo endoplasmático, onde são armazenados.

PROTEÍNAS MOTORAS

Função: Gerar movimento em células e tecidos.

Exemplos: A *miosina*, nas células do músculo esquelético, fornece a força necessária para o movimento em humanos; a *cinesina* interage com microtúbulos para movimentar organelas no interior da célula; a *dineína* promove o batimento de cílios e flagelos nas células eucarióticas.

PROTEÍNAS DE ARMAZENAMENTO

Função: Armazenar pequenas moléculas ou íons.

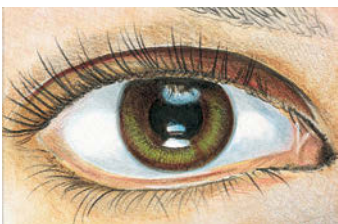
Exemplos: O ferro é armazenado no fígado ligado à *ferritina*; a *ovoalbumina*, proteína da clara do ovo, é utilizada como fonte de aminoácidos pelo embrião de aves; a *caseína*, proteína do leite, é utilizada como fonte de aminoácidos por bebês de mamíferos.

PROTEÍNAS SINALIZADORAS

Função: Transportar sinais de uma célula para outra.

Exemplos: Muitos hormônios e fatores de crescimento que coordenam funções fisiológicas em animais são proteínas; a *insulina*, por exemplo, é uma pequena proteína que controla os níveis de glicose no sangue; a *netrina* direciona o crescimento das células nervosas nos embriões em desenvolvimento; o *fator de desenvolvimento neural* (*nerve growth factor – NGF*) estimula o desenvolvimento de axônios em alguns tipos de células nervosas; o *fator de crescimento epidérmico* (*epidermal growth factor – EGF*) estimula o crescimento e a divisão de células epiteliais.

PROTEÍNAS RECEPTORAS

Função: Detectar sinais e transmiti-los à maquinaria de resposta celular.

Exemplos: A *rodopsina*, na retina, detecta luz; o *receptor de acetilcolina*, na membrana de células musculares, recebe sinais químicos liberados por terminações nervosas; os *receptores de insulina* permitem que hepatócitos respondam ao hormônio insulina com a absorção de glicose; os *receptores adrenérgicos*, no músculo cardíaco, aumentam a taxa de batimentos cardíacos ao se ligarem à adrenalina.

PROTEÍNAS DE REGULAÇÃO GÊNICA

Função: Ligar-se ao DNA, ativando ou reprimindo a transcrição gênica.

Exemplos: O *repressor de lactose*, em bactérias, silencia o gene para a enzima responsável pela degradação da lactose; várias *proteínas homeodomínio* agem como "interruptores" genéticos que controlam o desenvolvimento em organismos multicelulares, incluindo humanos.

PROTEÍNAS DE FINALIDADES ESPECÍFICAS

Função: Variáveis.

Exemplos: Os organismos produzem muitas proteínas altamente especializadas. Essas moléculas ilustram a vasta gama de funções que uma proteína pode desempenhar. *Proteínas anticongelantes* previnem o congelamento do sangue de peixes árticos e antárticos; a *proteína fluorescente verde* das águas-vivas emite uma luz verde; a *monelina*, proteína encontrada em plantas africanas, possui intenso sabor doce; os mexilhões e outros organismos marinhos secretam *proteínas adesivas* que os mantêm firmemente aderidos a rochas, mesmo quando submersos na água dos mares.

nados. Então examinaremos como a célula controla a atividade e a localização das proteínas. Por fim, apresentaremos uma breve descrição das técnicas utilizadas por biólogos para trabalhar com proteínas, incluindo métodos de purificação – a partir de tecidos ou cultura de células – e de determinação das suas estruturas.

A FORMA E A ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS

Do ponto de vista químico, as proteínas são as moléculas mais complexas e funcionalmente sofisticadas que se conhece. Isso talvez não seja surpreendente, levando-se em consideração que a estrutura e a atividade de cada proteína tenha sido desenvolvida e refinada ao longo de bilhões de anos da história evolutiva. Começaremos considerando como a posição de cada aminoácido, na longa cadeia peptídica que forma uma proteína, determina sua topologia tridimensional, uma estrutura estabilizada por interações não covalentes entre diferentes partes da molécula. A compreensão da estrutura proteica em nível atômico nos permite descrever como a topologia específica de cada proteína determina sua função na célula.

A forma de uma proteína é especificada por sua sequência de aminoácidos

Proteínas, como se pode recordar do Capítulo 2, são constituídas a partir de um conjunto de 20 aminoácidos diferentes, cada um com propriedades químicas distintas. Uma molécula **proteica** é formada por uma longa cadeia desses aminoácidos, conectados por ligações covalentes peptídicas (Figura 4-1). Assim, as proteínas são também chamadas de **polipeptídeos** ou **cadeias polipeptídicas**. Em cada tipo de proteína, os aminoácidos estão presentes em uma ordem única, que é exatamente a mesma em cada molécula desse tipo de proteína. Uma molécula de insulina, por exemplo, possui a mesma sequência de aminoácidos que qualquer outra molécula de insulina. Milhares de proteínas já foram identificadas, cada uma com sua própria sequência de aminoácidos.

Cada cadeia polipeptídica consiste em uma cadeia principal que sustenta as diferentes cadeias laterais. A **cadeia principal** é formada por uma se-

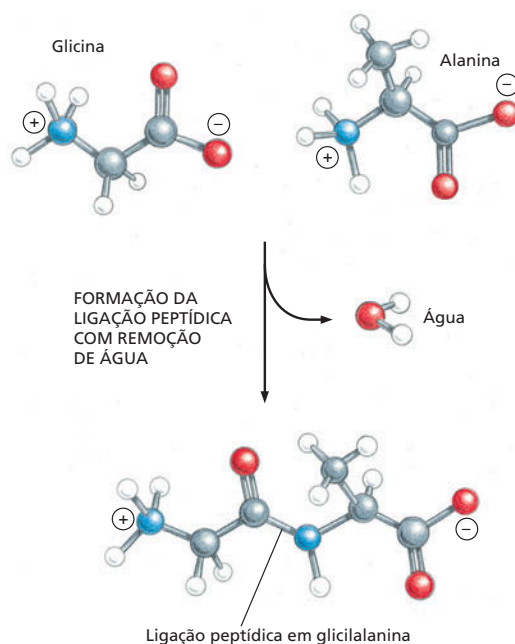
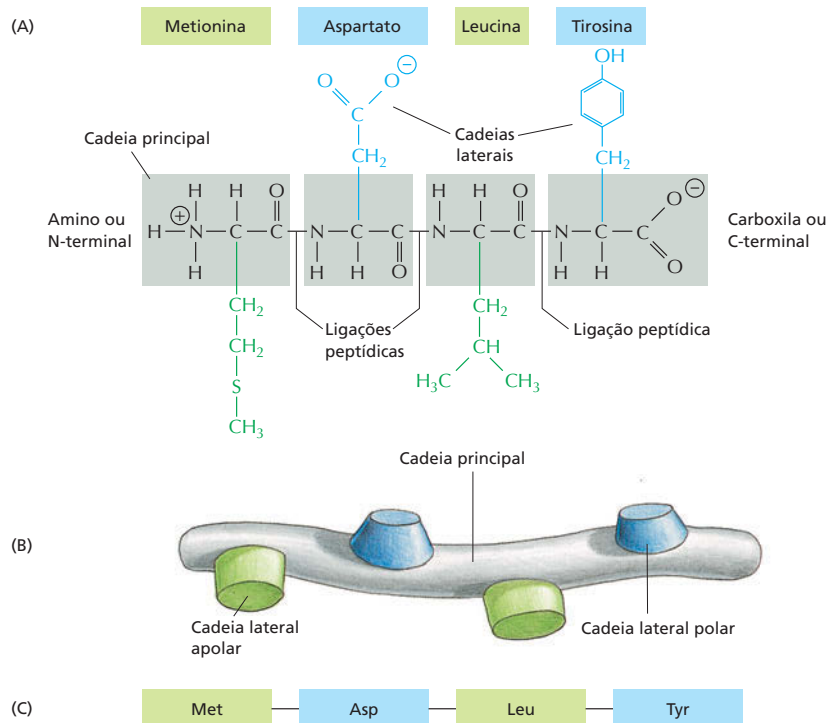



Figura 4-1 Os aminoácidos são conectados por ligações peptídicas. Uma ligação peptídica covalente se forma quando o átomo de carbono do grupo carboxila de um aminoácido compartilha seus elétrons com o átomo de nitrogênio (*azul*) do grupo amino de um segundo aminoácido. Uma molécula de água é gerada durante essa reação de condensação. No diagrama, átomos de carbono estão representados em *cinza*, átomos de nitrogênio em *azul*, átomos de oxigênio em *vermelho* e átomos de hidrogênio em *branco*.

Figura 4-2 Proteínas são formadas por aminoácidos unidos por meio de ligações peptídicas. (A) Aminoácidos ligados por meio da reação mostrada na Figura 4-1 formam a cadeia principal de um polipeptídeo, cuja estrutura é constante (destacados em *cinza*) e de onde se projetam as cadeias laterais dos aminoácidos. Um pequeno polipeptídeo de apenas quatro aminoácidos é mostrado na figura. As proteínas são tipicamente compostas por várias centenas de aminoácidos. As duas terminações de cada cadeia polipeptídica são quimicamente distintas: a terminação que possui o grupo amino livre (NH^{3+} ou NH_2) é chamada de amino, ou N-terminal; a terminação que possui o grupo carboxila livre (COO^-, ou COOH) é chamada de carboxila, ou C-terminal. (B) As posições das cadeias laterais quimicamente distintas, por exemplo, cadeias laterais polares e apolares, fornecem às proteínas as suas propriedades específicas. (C) A sequência de aminoácidos de uma proteína é sempre apresentada na direção N para C-terminal, da esquerda para a direita.

quência repetida de átomos centrais dos aminoácidos que formam a cadeia. Dessa cadeia principal repetitiva, pode projetar-se qualquer uma das 20 **cadeias laterais** distintas de aminoácidos – as cadeias laterais são a porção do aminoácido não envolvida na formação da ligação peptídica (**Figura 4-2**). A cadeia lateral confere a cada aminoácido suas propriedades únicas. Algumas são apolares e hidrofóbicas (repelem a água), outras são carregadas positiva ou negativamente; outras são quimicamente reativas, etc. A estrutura atômica dos 20 aminoácidos encontrados em proteínas é apresentada no Painel 2-5 (p. 72-73), e uma lista dos aminoácidos e suas abreviações pode ser vista na **Figura 4-3**.

Longas cadeias polipeptídicas são bastante flexíveis: muitas das ligações covalentes que unem átomos de carbono em uma cadeia estendida de aminoácidos permitem a livre rotação dos átomos que mantêm unidos. Dessa maneira,

AMINOÁCIDO			CADEIA LATERAL
Aspartato	Asp	D	negativa
Glutamato	Glu	E	negativa
Arginina	Arg	R	positiva
Lisina	Lys	K	positiva
Histidina	His	H	positiva
Asparagina	Asn	N	polar não carregada
Glutamina	Gln	Q	polar não carregada
Serina	Ser	S	polar não carregada
Treonina	Thr	T	polar não carregada
Tirosina	Tyr	Y	polar não carregada

AMINOÁCIDOS POLARES (hidrofílicos)

AMINOÁCIDO			CADEIA LATERAL
Alanina	Ala	A	apolar
Glicina	Gly	G	apolar
Valina	Val	V	apolar
Leucina	Leu	L	apolar
Isoleucina	Ile	I	apolar
Prolina	Pro	P	apolar
Fenilalanina	Phe	F	apolar
Metionina	Met	M	apolar
Triptofano	Trp	W	apolar
Cisteína	Cys	C	apolar

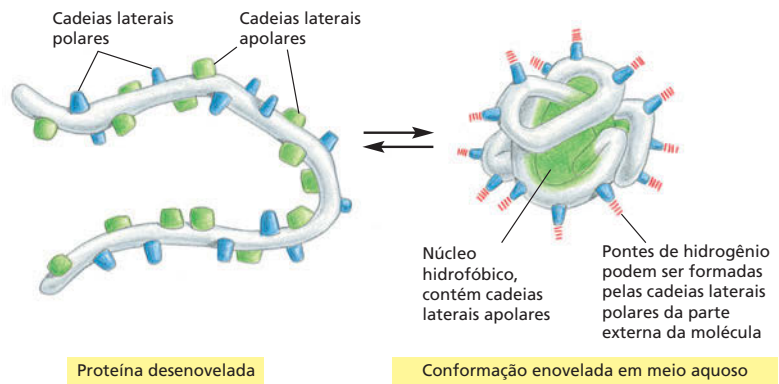
AMINOÁCIDOS APOLARES (hidrofóbicos)

Figura 4-3 Vinte aminoácidos diferentes são encontrados nas proteínas. São apresentadas as abreviações de 3 letras e 1 letra. Há o mesmo número de cadeias laterais de aminoácidos polares e apolares. Para estruturas atômicas, ver Painel 2-5 (p. 72-73).

Figura 4-4 Três tipos de ligações não covalentes atuam no enovelamento de proteínas. Mesmo sendo fracas individualmente, a combinação de muitas dessas ligações forma um forte arranjo de ligações que estabiliza uma estrutura tridimensional específica, como mostrado nesse pequeno peptídeo (*centro*). R é a designação geral para cadeia lateral. O enovelamento de proteínas também é mediado por interações hidrofóbicas, como mostrado na Figura 4-5.

as proteínas podem, em princípio, enovelar-se em uma variedade de formas. A estrutura de uma cadeia enovelada é mantida por uma série de interações não covalentes mais fracas, que se formam entre os seus aminoácidos. Essas ligações envolvem átomos da cadeia principal e da cadeia lateral. As ligações não covalentes que ajudam a manter a forma das proteínas incluem as pontes de hidrogênio, as interações eletrostáticas e as interações de van der Waals, descritas no Capítulo 2 (ver Painel 2-7, p. 76-77). Como as ligações não covalentes são muito mais fracas individualmente do que as ligações covalentes, são necessárias diversas ligações não covalentes para manter duas regiões de uma cadeia polipeptídica unida com a estabilidade adequada. A estabilidade de uma proteína enovelada será, portanto, afetada pela força combinada de um grande número de ligações não covalentes (**Figura 4-4**).

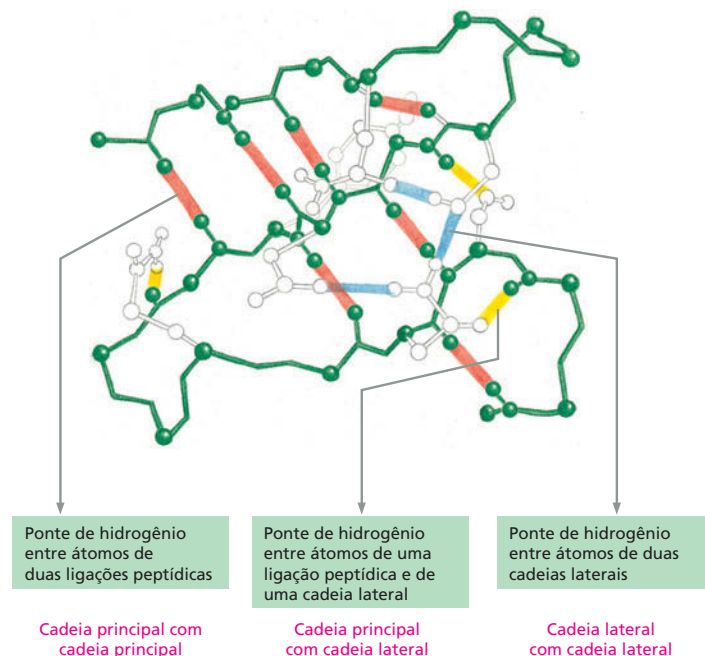
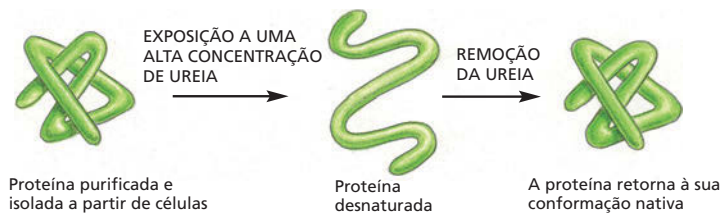
Uma quarta força, a interação hidrofóbica, desempenha também um papel central na determinação da forma de uma proteína. Em um ambiente aquoso, moléculas hidrofóbicas, incluindo cadeias laterais de resíduos de aminoácidos apolares, tendem a agrupar-se para minimizar o efeito disruptivo na rede de pontes de hidrogênio das moléculas de água circundante (ver Painel 2-2, p. 66-67). Portanto, um fator importante que rege o enovelamento de qualquer proteína é a distribuição de aminoácidos polares e apolares ao longo da sua cadeia polipeptídica. Cadeias laterais apolares (hidrofóbicas) – como as pertencentes aos resíduos de aminoácidos fenilalanina, leucina, valina e triptofano – tendem a agrupar-se no interior de proteínas enoveladas (da mesma forma que gotículas de óleo tendem a coalescer para formar uma gota maior). Protegidas no interior de uma proteína enovelada, cadeias laterais hidrofóbicas podem evitar contato com o citosol aquoso que as circunda no interior das células. Em contraste, cadeias laterais polares – como as pertencentes aos resíduos de aminoácidos arginina, glutamina e histidina – tendem a localizar-se na parte mais externa da proteína na sua forma enovelada, onde podem formar pontes de hidrogênio com a água circundante ou com outras moléculas polares (**Figura 4-5**). Quando aminoácidos polares se encontram no interior de proteínas, eles estão frequentemente ligados a outros aminoácidos polares ou mesmo à cadeia principal (**Figura 4-6**).

Figura 4-5 Interações hidrofóbicas ajudam as proteínas a se enovelarem em conformações compactas. Cadeias laterais polares tendem a ficar dispostas na porção mais externa de uma proteína enovelada, onde podem interagir com a água; as cadeias laterais apolares ficam no interior da molécula, formando um núcleo hidrofóbico altamente compacto, protegidas da água. Neste desenho esquemático, a proteína contém apenas cerca de 30 aminoácidos.

As proteínas se enovelam em uma conformação de energia mínima

Cada tipo de proteína possui uma estrutura tridimensional característica determinada pela ordem em que seus aminoácidos estão dispostos ao longo da cadeia polipeptídica. A estrutura final enovelada, ou **conformação**, adotada pela proteína é determinada por fatores energéticos: uma proteína geralmente se enovela na forma cuja energia livre (G) é minimizada (ver p. 91). O processo de enovelamento é estudado em laboratórios, utilizando proteínas altamente purificadas. Uma proteína pode ser desenovelada, ou *desnaturada*, por meio de solventes que rompem as interações não covalentes que a mantinham enovelada. Esse tratamento converte a proteína enovelada em uma cadeia polipeptídica flexível pela perda da sua forma natural. Quando o agente desnaturante é removido, a proteína em geral se enovela espontaneamente, ou seja, *renatura* para sua conformação original (**Figura 4-7**). O fato de que proteínas podem voltar a enovelar-se espontaneamente indica que toda informação necessária para especificar sua estrutura tridimensional está contida na sua sequência de aminoácidos.

Cada proteína normalmente se enovela em uma única conformação estável. Entretanto, essa conformação pode variar ligeiramente quando a proteína interage com outras moléculas da célula. Essa maleabilidade na forma é essencial para que a proteína exerça sua função, como veremos a seguir neste capítulo.

Figura 4-6 Pontes de hidrogênio entre os átomos de uma proteína ajudam a estabilizar a sua conformação enovelada. Um grande número de pontes de hidrogênio se forma entre regiões adjacentes de uma cadeia polipeptídica enovelada. A estrutura mostrada é uma parte da enzima lisozima. As pontes de hidrogênio entre os átomos da cadeia principal são mostradas em *vermelho*; as que são formadas entre átomos da ligação peptídica e átomos da cadeia lateral são mostradas em *amarelo*, e aquelas formadas entre átomos de duas cadeias laterais são mostradas em *azul*. Note que uma mesma cadeia lateral de um aminoácido pode fazer diversas pontes de hidrogênio. (De acordo com C.K. Mathews, K.E. van Holde, e K.G. Ahern, Biochemistry, 3. ed., São Francisco: Benjamin Cummings, 2000.)

Figura 4-7 **Proteínas desnaturadas podem retornar à sua conformação nativa.** Esse tipo de experimento demonstra que a conformação de uma proteína é determinada apenas pela sua sequência de aminoácidos. A renaturação é mais eficiente em proteínas pequenas.

Quando proteínas se enovelam de maneira errônea, pode ocorrer a formação de agregados que costumam danificar células e até mesmo tecidos. Agregados de proteínas são responsáveis por diversas doenças neurodegenerativas, incluindo o mal de Alzheimer e o mal de Huntington. Doenças priônicas – como o *scrapie* em ovelhas, a encefalopatia espongiforme bovina (*bovine spongiform encephalopathy* – BSE, ou o mal da "vaca louca") no gado e a síndrome de Creutzfeldt-Jacob (Creutzfeldt-Jacob disease – CJD) em humanos – também são causadas por agregados de proteínas. A proteína priônica, PrP, pode adotar uma forma erroneamente enovelada que é considerada "infecciosa", pois é capaz de converter formas da proteína Prp enoveladas corretamente em conformações anormais (**Figura 4-8**). Esse mecanismo permite à forma infecciosa da PrP disseminar-se rapidamente de uma célula à outra no cérebro, causando morte do animal (ou humano) infectado.

Apesar da capacidade de uma proteína atingir sua conformação correta sem ajudas externas, o enovelamento de proteínas em células vivas é frequentemente assistido por proteínas especiais chamadas de *chaperonas moleculares.* Essas proteínas se ligam às cadeias polipeptídicas parcialmente enoveladas e as ajudam a atingir sua conformação nativa da maneira mais favorável energeticamente, como será discutido no Capítulo 7. As chaperonas são extremamente importantes nas condições do citoplasma, pois elas impedem que proteínas recém-sintetizadas se associem erroneamente. Contudo, a conformação final tridimensional da proteína é especificada pela sua sequência de aminoácidos: as chaperonas apenas tornam o processo de enovelamento mais eficiente e confiável.

As proteínas existem em uma variedade de formas complicadas

Proteínas são macromoléculas cuja estrutura é mais variável nas células. Apesar de o seu tamanho poder variar desde 30 até mais de 10.000 aminoácidos, a maioria das proteínas apresenta entre 50 e 2.000 aminoácidos. Proteínas podem ser globulares ou fibrosas; podem formar filamentos, lâminas, anéis ou esferas. A **Figura 4-9** mostra algumas proteínas cuja estrutura exata é conhecida. Muitas dessas proteínas serão mencionadas neste capítulo e ao longo deste livro.

A resolução da estrutura de uma proteína geralmente começa com a determinação da sua sequência de aminoácidos, uma tarefa que pode ser realizada de diferentes modos. Por muitos anos, o sequenciamento de proteínas foi realizado pela análise direta dos aminoácidos em uma proteína purificada, sendo a *insulina* a primeira a ser totalmente sequenciada em 1955. Hoje, podemos determinar a sequência de aminoácidos de uma proteína de maneira muito mais fácil por meio do sequenciamento do gene que a codifica (discutido no Capítulo 10). Uma vez que se saiba a ordem dos nucleotídeos no DNA que codifica uma proteína, essa informação pode ser convertida na sequência de aminoácidos pela aplicação do código genético (discutido no Capítulo 7). As sequências de aminoácidos de milhares de proteínas já foram determinadas segundo essa metodologia, e foram coletadas em grandes bancos eletrônicos de dados que permitem aos usuários a obtenção da sequência de aminoácidos de qualquer proteína quase instantaneamente.

Figura 4-8 **Doenças priônicas são causadas por um tipo raro de proteínas cuja forma erroneamente enovelada é infecciosa.** A proteína PrP de mamíferos é a mais conhecida dessas proteínas, mas outros exemplos são conhecidos. (A) A proteína sofre uma rara alteração conformacional que origina a forma anormalmente enovelada do príon. (B) A forma anormal induz a conversão de proteínas Prp normais no cérebro do hospedeiro em suas formas errôneas, que geram agregados de proteínas que interferem no funcionamento do cérebro, causando doenças.

Figura 4-9 As proteínas existem em uma variedade de formas e de tamanhos. Cada proteína é mostrada no modelo de preenchimento espacial e representada na mesma escala. No canto superior esquerdo, está o domínio SH2, que é descrito em detalhes no Painel 4-2 (p. 128-129). Para comparação, é mostrada parte da molécula de DNA (*cinza*) ligada a uma proteína. (Segundo David S. Goodsell, Our Molecular Nature. Nova York: Springer-Verlang, 1996. Com a permissão da Springer Science and Business Media.)

Embora toda a informação necessária para o enovelamento de uma proteína esteja contida na sua sequência de aminoácidos, ainda não foi desenvolvida uma técnica que permita a predição confiável de sua conformação tridimensional – o arranjo espacial de seus átomos – a partir apenas da sua sequência de aminoácidos. No momento, os únicos métodos para determinação precisa da estrutura de qualquer proteína são os experimentos de difração de raios X e de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), como discutiremos adiante neste Capítulo. As estruturas de aproximadamente 20.000 proteínas diferentes já foram completamente analisadas por essas técnicas. Muitas possuem conformações tridimensionais tão intricadas que um capítulo inteiro seria necessário para sua descrição em detalhes.

Como a estrutura de uma proteína composta por diversos aminoácidos pode conter um volume de informações muito grande, ilustraremos as peculiaridades da conformação de uma proteína por meio da análise de um pequeno *domínio proteico*. Como foi brevemente discutido, a maior parte das proteínas é composta por múltiplos domínios, cada um enovelado em uma estrutura tridimensional compacta. No **Painel 4-2** (p. 128-129), são apresentadas quatro representações diferentes do domínio SH2: como um domínio proteico que parte de proteínas envolvidas com a sinalização celular, possui importantes funções nas células eucarióticas. Composta por uma cadeia de 100 aminoácidos, a estrutura é mostrada como (A) apenas sua cadeia principal, (B) como modelo de fitas, (C) no modelo de palitos, incluindo as cadeias laterais e (D) como um modelo de preenchimento espacial. Como indicado no painel, cada modelo enfatiza diferentes características do polipeptídeo. As três linhas horizontais mostram o domínio SH2 em diferentes orientações, e as imagens estão coloridas conforme o sentido da cadeia polipeptídica, da porção N-terminal *(roxo)* para C-terminal *(vermelho).* Descreveremos os elementos estruturais dessa proteína brevemente.

A partir do Painel 4-2, podemos observar claramente o quão complexa é a conformação de uma proteína, mesmo de um domínio pequeno como o domínio SH2. Para a visualização dessas estruturas complexas, cientistas desenvolveram várias ferramentas e programas de visualização gráfica capazes de gerar uma variedade de imagens de uma proteína; algumas das quais são mostradas no Painel 4-2. Essas imagens podem ser mostradas em uma tela e manipuladas para observação de todos os aspectos da sua estrutura (**Animação 4.1**). Além disso, a descrição e a representação dessas estruturas proteicas complexas se tornam mais fáceis pelo reconhecimento de diversos motivos estruturais comuns que compõem essas conformações, como será discutido na próxima seção.

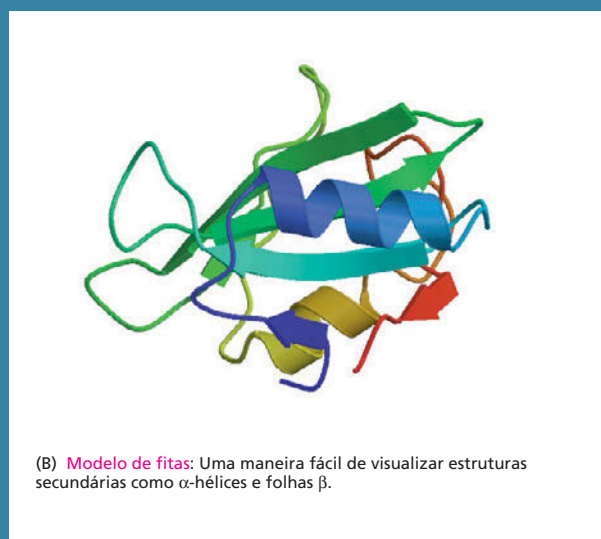
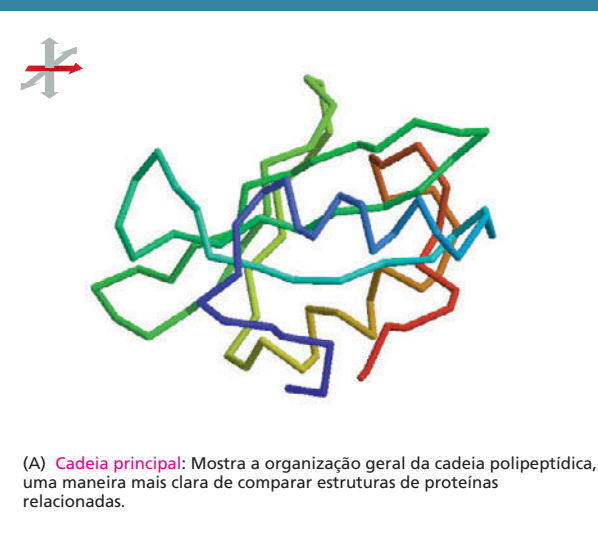
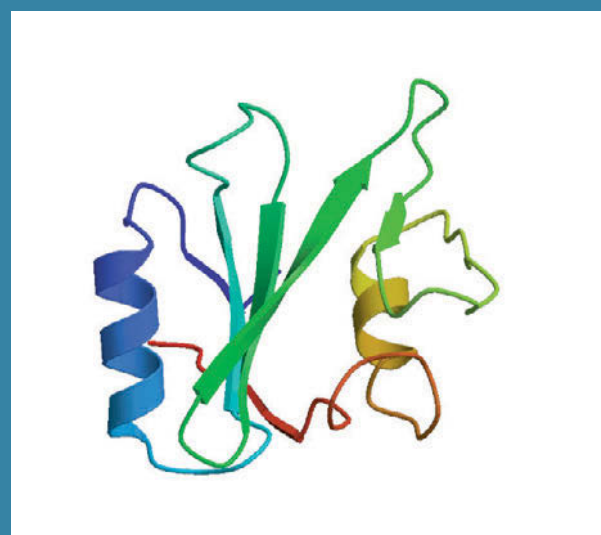
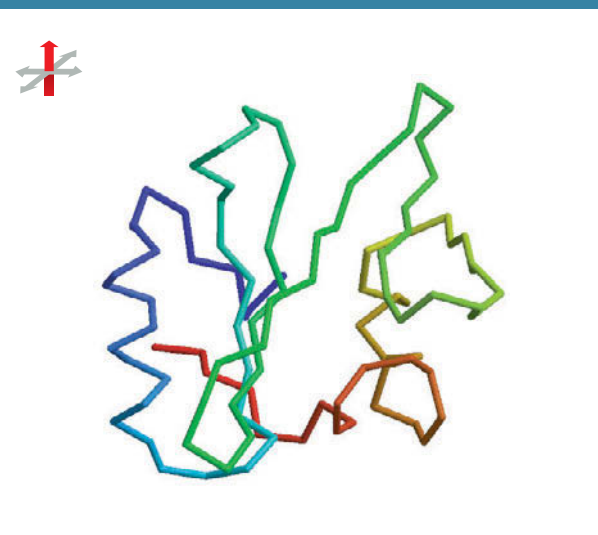
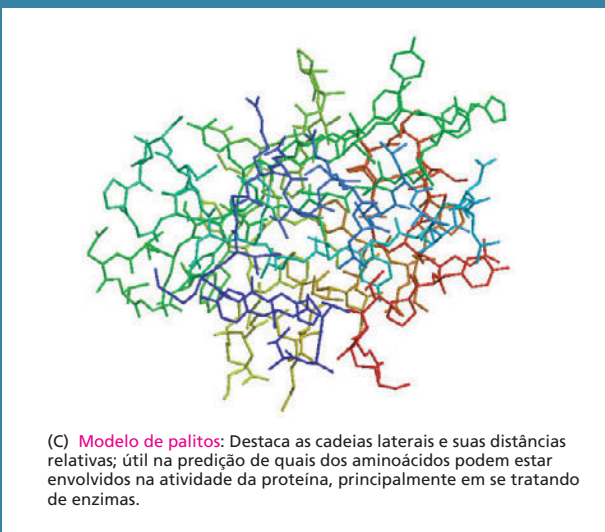
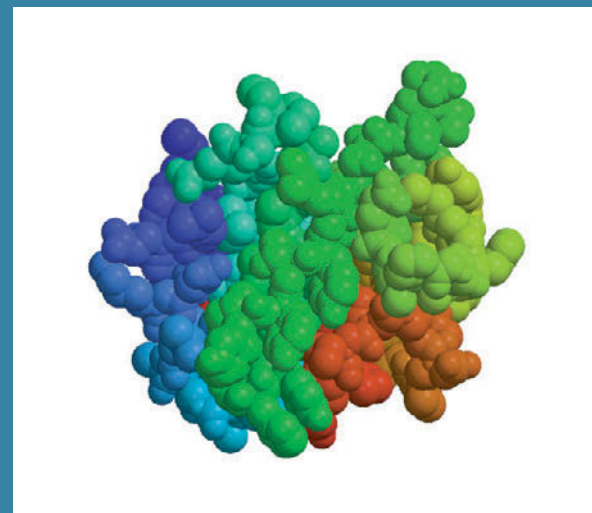
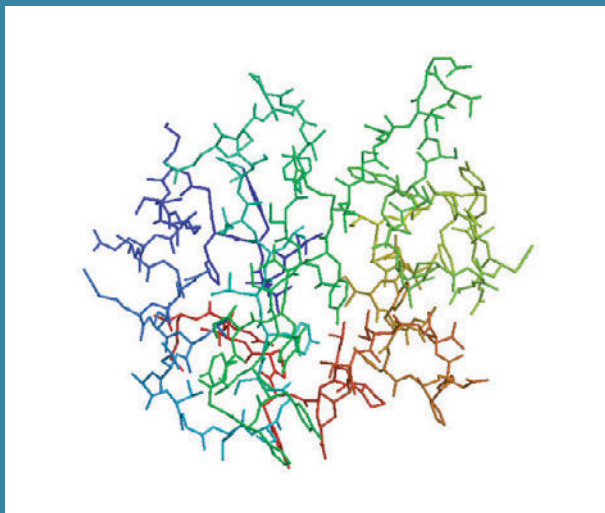
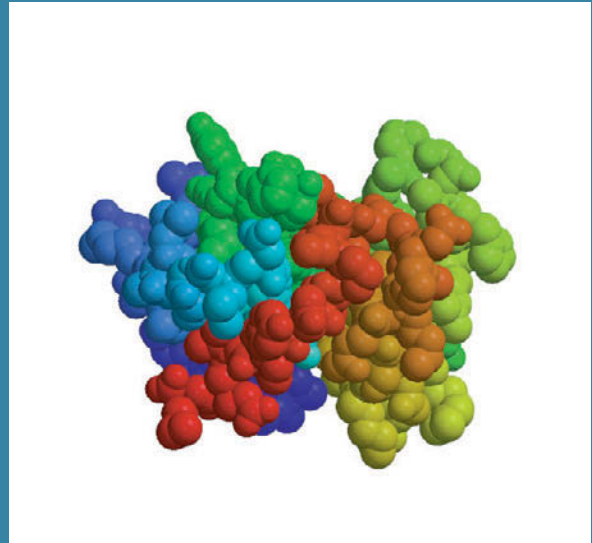
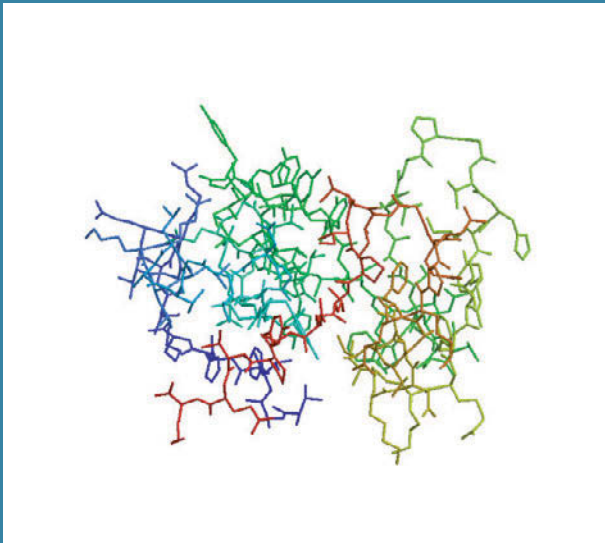
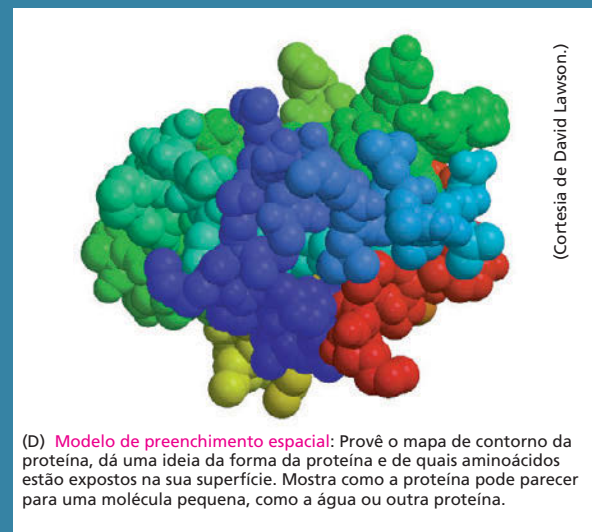
A α-hélice e a folha β são padrões comuns de enovelamento

Quando estruturas tridimensionais de várias proteínas diferentes são comparadas, torna-se claro que, apesar de cada uma possuir uma conformação característica, dois padrões regulares de enovelamento geralmente estão presentes. Esses dois motivos foram descobertos há aproximadamente 50 anos a partir de estudos em cabelo e seda. O primeiro motivo estrutural a ser descoberto, denominado **α-hélice**, foi observado na proteína *α-queratina,* abundante na pele e em seus derivados – cabelo, unhas e chifres. Um ano após a descoberta das α-hélices, um segundo motivo estrutural foi também descoberto, a **folha β**, encontradas na proteína *fibroína,* principal constituinte da seda. (Os biólogos geralmente utilizam letras gregas para denominar suas descobertas; o primeiro exemplo recebe a designação α, o segundo β, e assim por diante.)

Esses dois motivos estruturais são particularmente comuns, pois resultam da formação de pontes de hidrogênio entre grupamentos N-H e C=O na cadeia principal de polipeptídeos. Como as cadeias laterais não participam na formação das pontes de hidrogênio desses motivos, α-hélices e folhas β podem ser formadas por diferentes sequências de aminoácidos. Em cada caso, a cadeia proteica adota um motivo estrutural regular e repetitivo. Os elementos estruturais, e os símbolos utilizados para representá-los como modelos estruturais, são apresentados na **Figura 4-10**.

PAINEL 4-2 Quatro maneiras diferentes de representar o pequeno domínio proteico SH2

(A) Cadeia principal: Mostra a organização geral da cadeia polipeptídica, uma maneira mais clara de comparar estruturas de proteínas relacionadas.

(B) Modelo de fitas: Uma maneira fácil de visualizar estruturas secundárias como α-hélices e folhas β.

(C) Modelo de palitos: Destaca as cadeias laterais e suas distâncias relativas; útil na predição de quais dos aminoácidos podem estar envolvidos na atividade da proteína, principalmente em se tratando de enzimas.

(D) Modelo de preenchimento espacial: Provê o mapa de contorno da proteína, dá uma ideia da forma da proteína e de quais aminoácidos estão expostos na sua superfície. Mostra como a proteína pode parecer para uma molécula pequena, como a água ou outra proteína.

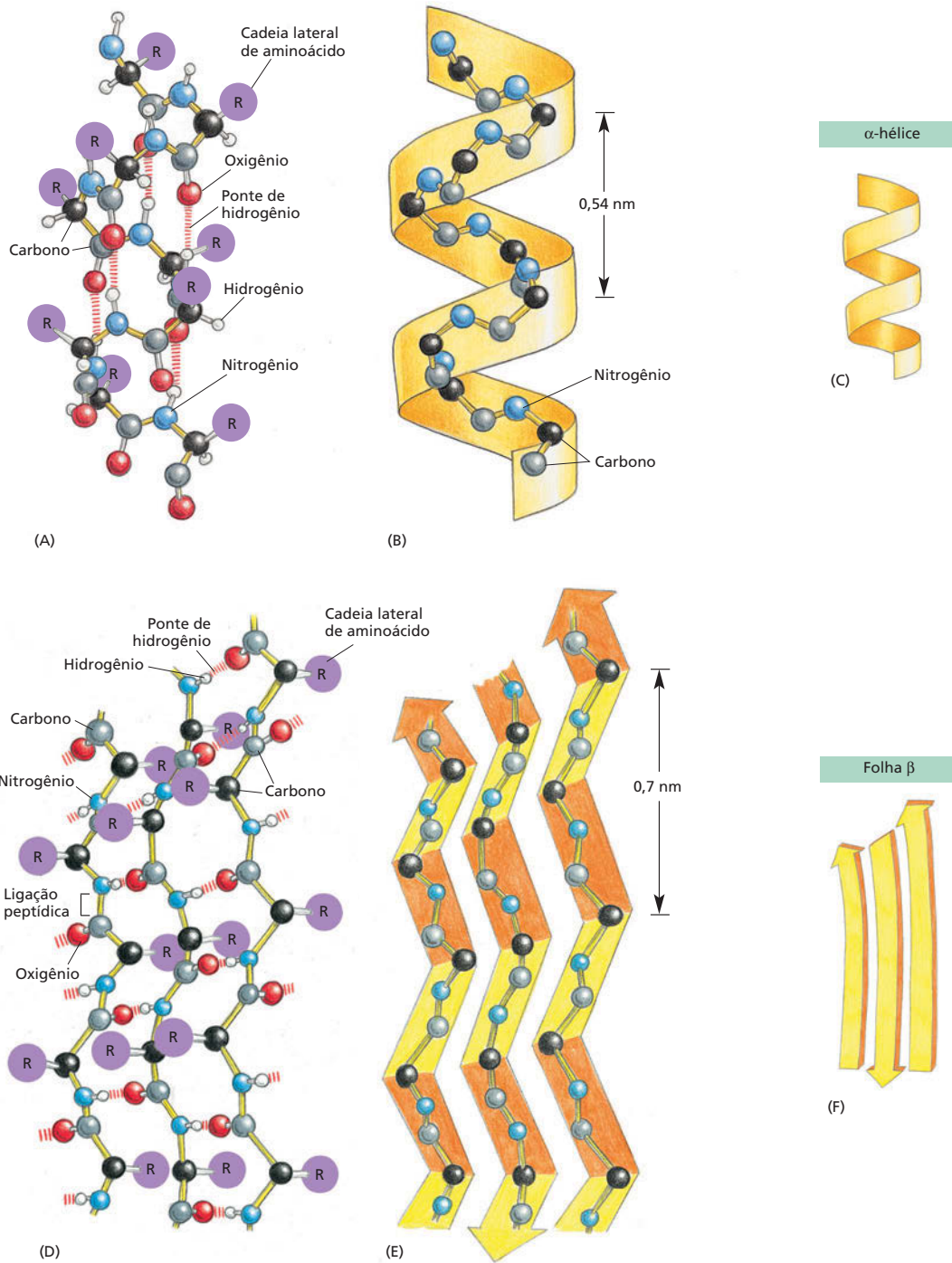



Figura 4-10 Cadeias polipeptídicas geralmente se enovelam em um dos motivos estruturais repetidamente ordenados, conhecidos como α-hélices ou folhas β. (A-C) Em uma α-hélice, o N-H de cada ligação peptídica está ligado por uma ponte de hidrogênio ao C=O da ligação peptídica do resíduo de aminoácido situado quatro posições à frente na cadeia. (D-F) No caso de folhas β, cadeias polipeptídicas individuais (fitas β) são mantidas unidas em uma mesma folha por meio de pontes de hidrogênio entre as ligações peptídicas de cadeias diferentes, e as cadeias laterais dos aminoácidos se projetam alternadamente acima e abaixo do plano da folha. No exemplo mostrado, as cadeias polipeptídicas adjacentes possuem sentidos opostos, formando uma folha β antiparalela. (A) e (D) mostram todos os átomos da cadeia principal e as cadeias laterais representadas por R. (B) e (E) mostram apenas os átomos de carbono e nitrogênio da cadeia principal, e (C) e (F) mostram a representação esquemática utilizada para representar α-hélices e folhas β, no modelo de fitas (ver Painel 4-2B, p. 129).

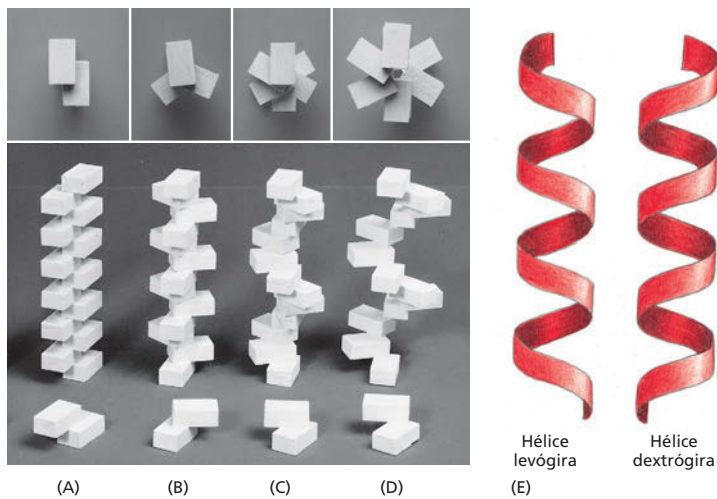



Figura 4-11 A hélice é uma estrutura biológica regular. Uma hélice se forma quando uma série de subunidades se liga umas às outras de forma regular (A–D). Na parte inferior, é mostrada a interação entre duas subunidades e atrás delas a hélice resultante. Essas hélices possuem duas (A), três (B) ou seis (C e D) subunidades por volta da hélice. Na parte superior, uma vista de cima do arranjo das subunidades das hélices. Note que a hélice em (D) possui um passo maior do que a hélice em (C), mas o mesmo número de subunidades por volta. (E) Uma hélice pode ser dextrógira ou levógira. Apenas como referência, é útil lembrar que parafusos-padrão são dextrógiros, ou seja, são parafusados no sentido horário, da esquerda para a direita. Note que a hélice mantém a sua orientação mesmo quando virada de cabeça para baixo.

QUESTÃO 4-2

Olhe os modelos do domínio proteico no Painel 4-2, p. 128-129. As α-hélices são dextrógiras ou levógiras? As três cadeias que formam a região maior da folha β são paralelas ou antiparalelas? Começando pela porção N-terminal (extremidade *roxa*), siga ao longo da cadeia peptídica. Existe algum "nó"? Por quê? Por que não?

As hélices se formam rapidamente nas estruturas biológicas

A abundância de hélices encontradas em proteínas não é um fato surpreendente. Uma **hélice** é uma estrutura regular que lembra uma escada em espiral, como ilustrado na Figura 4-11. Ela é gerada simplesmente pelo arranjo de subunidades similares próximas umas às outras e, rigorosamente, com a mesma relação entre cada uma dessas subunidades. Por ser muito raro que subunidades se arranjem em linha reta, essa repetição geralmente resulta na formação de uma hélice. Dependendo do giro – da rotação da hélice –, ela pode ser dextrógira ou levógira (Figura 4-11E). Essa orientação não é afetada virando a hélice de cabeça para baixo, mas se inverte na sua imagem especular.

Uma α-hélice é formada quando uma única cadeia polipeptídica gira em torno do seu eixo para formar um cilindro estruturalmente rígido. Uma ponte de hidrogênio se forma a cada quatro aminoácidos, conectando o C=O de uma ligação peptídica com o N-H da outra (ver Figura 4-10A). Isso origina uma hélice regular com uma volta completa a cada 3,6 aminoácidos (Animação 4.2).

Pequenas regiões de α-hélices são especialmente abundantes em proteínas de membrana, como as de transporte e as receptoras. Veremos no Capítulo 11 que essas porções da proteína de membrana que atravessam a bicamada lipídica geralmente formam uma α-hélice composta principalmente por aminoácidos de cadeia lateral apolar. A cadeia principal do polipeptídeo, que é hidrofílica, forma pontes de hidrogênio entre os átomos que compõem a própria α-hélice e permanece protegida do ambiente lipídico e hidrofóbico da membrana pelas suas cadeias laterais apolares (Figura 4-12).

Algumas vezes, duas (ou três) α-hélices podem enrolar-se uma sobre a outra, formando uma estrutura estável conhecida como **espiral enrolada** (***coiled-coil***). Essa estrutura se forma quando as α-hélices possuem a maior parte das cadeias laterais de seus aminoácidos apolares (hidrofóbicos) voltados para um mesmo lado, de modo que elas possam se enrolar dispondo essas cadeias laterais na parte em contato entre as duas – minimizando o contato dessas cadeias laterais com o citosol aquoso (Figura 4-13). Longas espirais enroladas formam a base de muitas proteínas alongadas. Exemplos incluem a α-queratina, que forma fibras intracelulares que reforçam a camada mais externa da pele, e a miosina, proteína responsável pela contração muscular (discutida no Capítulo 17).

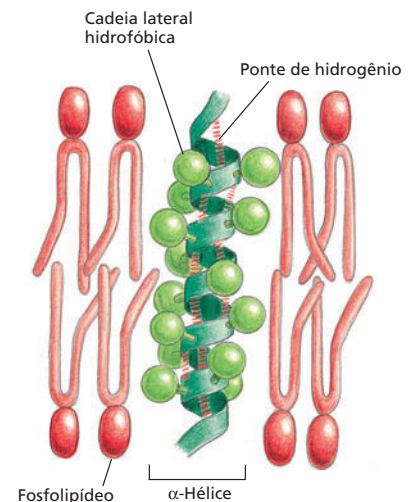
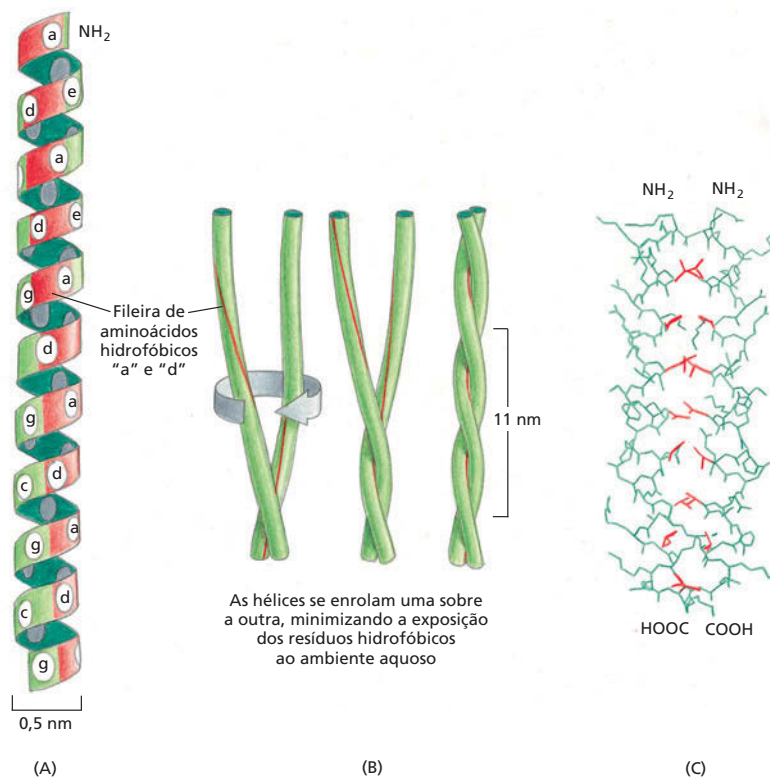



Figura 4-12 Um segmento de α-hélice pode atravessar a bicamada lipídica. As cadeias laterais hidrofóbicas dos aminoácidos constituintes da α-hélice interagem com as caudas hidrocarbonadas hidrofóbicas das moléculas de fosfolipídeos, enquanto a porção hidrofílica da cadeia principal do polipeptídeo forma pontes de hidrogênio entre seus átomos, no interior na hélice. Aproximadamente 20 aminoácidos são necessários para atravessar a membrana transversalmente.

Figura 4-13 α-Hélices entrelaçadas podem formar espirais enroladas (*coiled-coils*). (A) Uma α-hélice é mostrada com as cadeias laterais de seus aminoácidos marcados como heptâmeros "abcdefg". Aminoácidos "a" e "d" nesta sequência ficam dispostos próximos na superfície cilíndrica, formando uma fileira (em *vermelho*) que se desloca lentamente em torno da α-hélice. Proteínas que formam espirais enroladas possuem aminoácidos apolares nas posições "a" e "d". Consequentemente, como mostrado em (B), duas α-hélices podem enrolar-se com as cadeias laterais apolares de uma interagindo com as cadeias laterais apolares da outra, e as cadeias laterais mais hidrofílicas permanecem mais expostas ao ambiente aquoso. (C) Estrutura atômica de uma espiral enrolada determinada por cristalografia por raios X. Em *vermelho*, as cadeias laterais apolares. Espirais enroladas também podem formar-se a partir de três α-hélices (**Animação 4.3**).

QUESTÃO 4-3

Lembrando que as cadeias laterais de cada cadeia polipeptídica se projetam alternadamente acima e abaixo do plano da folha β (ver Figura 4-10D), considere a seguinte sequência proteica: Leu-Lys-Val-Asp-Ile-Ser-Leu-Arg-Leu-Lys-Ile-Arg-Phe-Glu. Você vê algo notável no arranjo desses aminoácidos quando incorporados em uma folha β? Você pode fazer alguma predição de como esta folha β pode estar disposta em uma proteína?
Dica: consulte as propriedades dos aminoácidos listados na Figura 4-3.

As folhas β formam estruturas rígidas no núcleo de muitas proteínas

O pequeno domínio proteico SH2 que examinamos no Painel 4-2 contém em sua estrutura tanto α-hélices quanto folhas β. Folhas β são compostas quando pontes de hidrogênio são formadas entre cadeias polipeptídicas dispostas lado a lado (ver Figura 4-10D). Quando essa estrutura é formada por cadeias polipeptídicas adjacentes dispostas no mesmo sentido (digamos da porção N-terminal para C-terminal), ela é considerada uma *folha β paralela;* quando é formada por cadeias dispostas em sentidos contrários, a estrutura é uma *folha β antiparalela* (**Figura 4-14**). Os dois tipos de folhas β produzem uma estrutura plissada muito rígida que constitui o núcleo de muitas proteínas. O domínio SH2, por exemplo, possui uma região central composta por uma folha β antiparalela.

Folhas β possuem propriedades notáveis. Elas conferem à seda sua extraordinária força elástica. Elas previnem o congelamento de insetos no frio. Em uma proteína anticongelante, isolada de um besouro adaptado ao clima frio, uma série de folhas β paralelas forma uma superfície lisa ao longo de um dos lados da molécula proteica (**Figura 4-15**). Esse arranjo parece ser uma plataforma ideal para a ligação das moléculas de água, regularmente espaçadas, presentes em cristais de gelo. Pela adesão aos cristais de gelo em formação, quando a água é resfriada a temperaturas abaixo do seu ponto de congelamento, proteínas anticongelantes impedem o crescimento desses cristais, evitando que as células do inseto congelem.

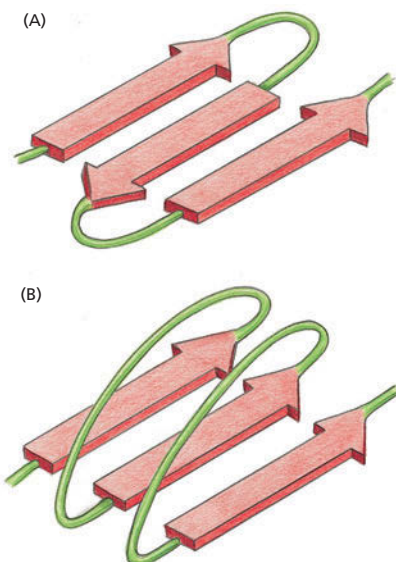



Figura 4-14 Há dois tipos de folhas β. (A) Folha β antiparalela (ver também Figura 4-10D). (B) Folha β paralela. Ambas estruturas são comuns em proteínas. Por convenção, a seta aponta na direção C-terminal da cadeia polipeptídica (**Animação 4.4**).

As proteínas possuem vários níveis de organização

A estrutura de uma proteína não se limita a α-hélices e folhas β; há ainda níveis superiores de organização. Esses níveis de organização não são independentes, eles são construídos um após o outro até que a estrutura tridimensional final da proteína esteja completamente definida. Uma estrutura proteica começa com sua sequência de aminoácidos, que é considerada sua *estrutura primária.* O próximo nível de organização inclui as α-hélices e as folhas β que se formam em alguns segmentos da cadeia polipeptídica; esses motivos estruturais são elementos da **estrutura secundária** da proteína. A conformação completa, tridimensional, formada por toda a cadeia polipeptídica – incluindo α-hélices, folhas β, espiras desordenadas *(random coils)* e qualquer outra volta ou alça que se forme entre as extremidades N e C terminal –, é chamada de *estrutura terciária* (para exemplos, veja as estruturas mostradas no Painel 4-2). Por fim, se uma molécula proteica é formada por um complexo de mais de uma cadeia polipeptídica, então a estrutura completa desse complexo é designada *estrutura quaternária.*

Estudos de conformação, função e evolução de proteínas revelaram a importância de um nível de organização distinto dos anteriormente descritos. Essa unidade de organização é o **domínio proteico**, que é definido como qualquer segmento de uma cadeia polipeptídica capaz de enovelar-se de forma independente em uma estrutura compacta e estável, como foi visto no caso do domínio SH2 (ver Painel 4-2, p. 128-129). Um domínio geralmente é composto por 100 a 250 aminoácidos (enovelados como α-hélices, folhas β e outros elementos de estrutura secundária) e é a unidade sobre a qual muitas proteínas maiores são construídas (**Figura 4-16**). Os diferentes domínios de uma proteína são frequentemente associados a diferentes funções. Por exemplo, em bactérias, a *proteína ativadora de catabólitos* (CAP – *catabolite activator protein),* ilustrada na Figura 4-16, possui dois domínios: o menor se liga ao DNA, e o maior se liga ao AMP cíclico (cAMP), um sinalizador intracelular. Quando o domínio maior se liga ao cAMP, ele causa uma mudança conformacional na proteína que permite ao domínio menor ligar-se a uma sequência específica de DNA, promovendo a expressão dos genes adjacentes. O domínio SH2 (ver Painel 4-2) é observado em diferentes polipeptídeos, onde atua como

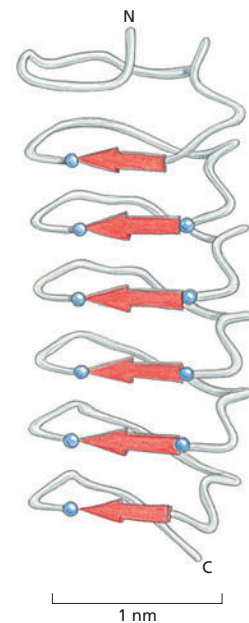



Figura 4-15 Folhas β fornecem uma superfície ideal para a ligação do gelo em proteínas anticongelantes. A série de seis folhas β, aqui mostradas em *vermelho*, formam uma superfície lisa com 10 grupos hidroxila (*azul*) arranjados em distâncias correspondentes a moléculas de água quando congeladas. Assim, a proteína pode ligar cristais de gelo, evitando o seu crescimento. (De acordo com Y.C. Liou *et al.*, *Nature* 406:322-324, 2000. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

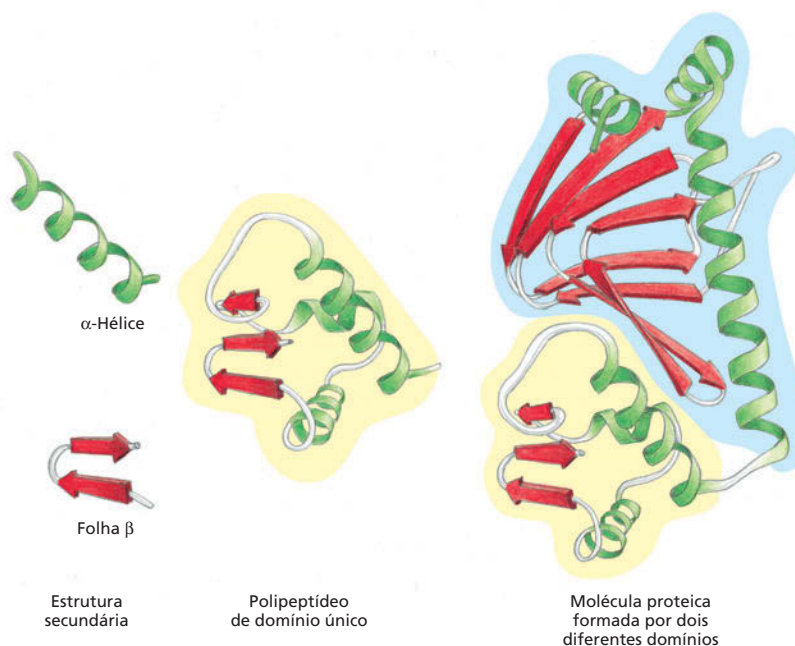
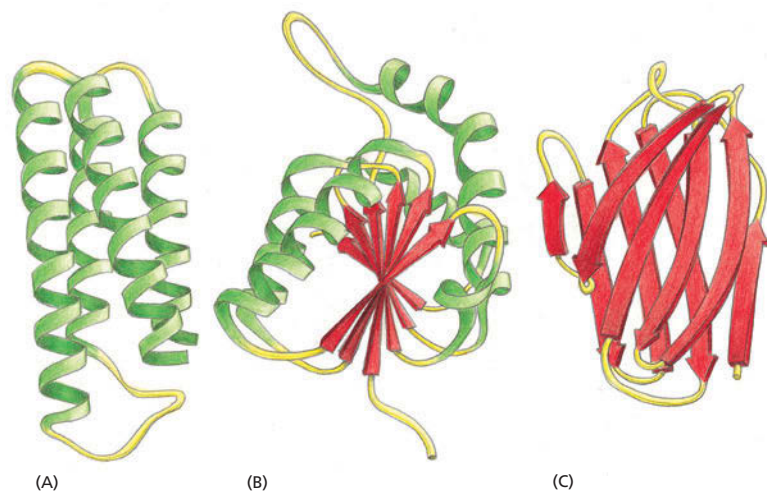



Figura 4-16 Muitas proteínas são formadas por domínios funcionais separados. Elementos de estrutura secundária como α-hélices e folhas β se empacotam em estruturas estáveis de enovelamento independente, chamados de domínios. Uma molécula proteica típica é formada por um ou mais domínios, geralmente conectados por regiões relativamente desestruturadas da cadeia polipeptídica. O modelo de fitas à direita é a proteína regulatória bacteriana CAP, com um domínio maior (destacado em *azul*) e um menor (destacado em *amarelo*).

Figura 4-17 Modelo de fitas de três diferentes domínios proteicos. (A) Citocromo b_{562}, uma proteína com único domínio, envolvida da transferência de elétrons em *E. coli*, composta quase que inteiramente por α-hélices. (B) Domínio de ligação de NAD da enzima desidrogenase láctica, composta por uma mistura de α-hélices e folhas β. (C) O domínio variável da cadeia leve de uma imunoglobulina (anticorpo) é composto por um "sanduíche" de duas folhas β. Nestes exemplos, as α-hélices são mostradas em *verde*, e as cadeias que compõem as folhas β são mostradas como *setas vermelhas*. As regiões de voltas (*amarelo*) geralmente são sítios de ligação para outras moléculas. (Modificado a partir dos originais cordialmente cedidos por Jane Richardson.)

um domínio de ligação que medeia interações proteína-proteína, como será visto no Capítulo 16.

Pequenas moléculas proteicas, como a mioglobina, a proteína muscular transportadora de oxigênio, contêm apenas um único domínio (ver Figura 4-9). Proteínas maiores podem conter dezenas de domínios, em geral conectados por cadeias polipeptídicas relativamente desestruturadas. Modelos de fitas de três diferentes domínios são apresentados na **Figura 4-17**.

Dentre as muitas cadeias polipeptídicas possíveis, poucas serão úteis

Teoricamente, um enorme número de cadeias polipeptídicas pode ser formado. Como cada um dos 20 aminoácidos é quimicamente distinto e pode, em princípio, ocupar qualquer posição em uma cadeia proteica, um peptídeo formado por quatro aminoácidos pode ter $20 \times 20 \times 20 \times 20 = 160.000$ possíveis sequências diferentes. Em outras palavras, para um peptídeo formado por *n* aminoácidos, há 20^n possíveis cadeias polipeptídicas diferentes. Para uma proteína típica, com 300 aminoácidos, mais de 20^{300} (ou seja, 10^{390}) cadeias polipeptídicas estruturalmente diferentes são, na teoria, possíveis.

Entretanto, apenas uma fração muito pequena desse número inimaginável de cadeias polipeptídicas irá adotar uma única conformação tridimensional estável. A maioria das proteínas terá várias diferentes conformações de estabilidade aproximadamente iguais, cada conformação possuindo diferentes propriedades químicas. Então, por que a maior parte das proteínas presentes em uma célula adota uma única e estável conformação? A resposta para essa pergunta é: uma proteína com diferentes conformações e propriedades não seria biologicamente útil, uma vez que ocorreriam mudanças inesperadas na sua função. Essas proteínas seriam eliminadas por seleção natural pelo processo de tentativa e erro em que se baseia a evolução (discutido no Capítulo 9).

Em virtude da seleção natural, a sequência de aminoácidos da maior parte das proteínas atualmente presentes nas células evoluiu de modo a garantir que o polipeptídeo adote uma conformação extremamente estável – uma estrutura que confere à proteína as propriedades químicas que irão permitir que ela desempenhe sua função catalítica ou estrutural na célula. A precisão na construção de uma proteína é tamanha que basta uma mudança em alguns átomos em um de seus aminoácidos para que ocorra perda da sua estrutura e, consequentemente, da sua função. De fato, muitas proteínas são tão estáveis e eficazes que são conservadas ao longo da evolução de diversos organismos. As estruturas tridimensionais do sítio de ligação ao DNA da proteína α2 de leveduras e da proteína Engrailed de *Drosophila,* por exemplo, são quase completa-

QUESTÃO 4-4

Mutações ao acaso raramente resultam em mudanças que melhoram a utilidade de uma proteína para a célula e, quando ocorrem, são selecionadas na evolução. Como essas mudanças são muito raras, para cada mutação útil, há inúmeras mutações que não resultam em melhoria, ou ainda em formas inativas da proteína. Por que então as células não contêm milhões de proteínas com formas diferentes e sem função?

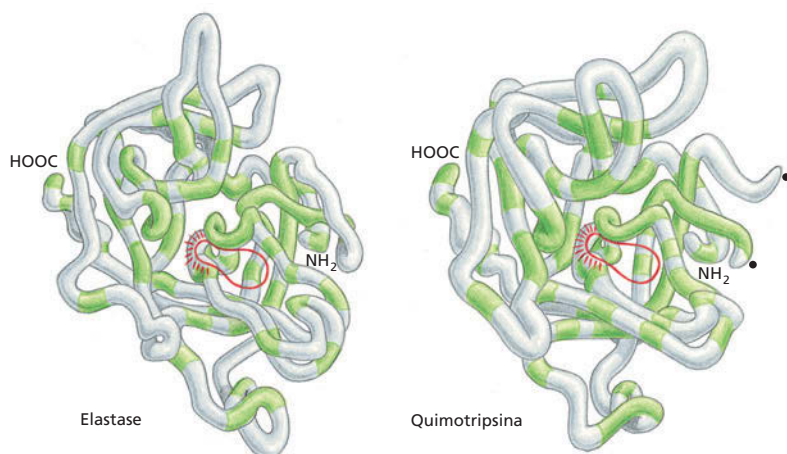



Figura 4-18 Serina-proteases pertencem a uma família de enzimas proteolíticas. São mostradas as conformações da cadeia principal de duas serina-proteases: elastase e quimotripsina. Embora apenas os aminoácidos mostrados em *verde* sejam os mesmos nas duas proteínas, suas conformações são bastante similares em toda a estrutura. O sítio ativo de cada enzima é destacado em *vermelho*. Nesse local, as ligações peptídicas que servem de substrato para essas enzimas são ligadas e clivadas por hidrólise. O nome serina-protease deriva do aminoácido serina, cuja cadeia lateral faz parte do sítio ativo dessas enzimas, participando diretamente da reação de clivagem. Os dois círculos pretos no *lado direito* da molécula de quimotripsina indicam as duas extremidades livres criadas onde a enzima clivou a sua própria cadeia principal.

mente iguais, mesmo que esses dois organismos sejam separados por mais de um bilhão de anos de evolução.

As proteínas podem ser classificadas em famílias

Uma vez que uma proteína tenha evoluído para uma conformação estável e com propriedades úteis, a sua estrutura pode ser modificada ao longo do tempo para que ela desempenhe novas funções. Sabemos que esse processo ocorreu com certa frequência durante a evolução, pois muitas proteínas presentes hoje podem ser agrupadas em **famílias de proteínas**, nas quais cada membro de uma família possui sequência de aminoácidos e conformação tridimensional que se assemelham aos demais membros da família.

Considere, por exemplo, as *serina-proteases –,* uma família de enzimas proteolíticas que inclui as enzimas digestórias quimotripsina, tripsina e elastase, bem como as diversas proteases envolvidas na coagulação sanguínea. Quando duas dessas proteínas são comparadas entre si, porções das suas sequências de aminoácidos são praticamente iguais. A similaridade das suas conformações tridimensionais é ainda mais notável: a maioria das voltas e torções em suas cadeias polipeptídicas é exatamente idêntica (**Figura 4-18**). Não obstante, as serina-proteases possuem atividades enzimáticas distintas, cada uma cliva diferentes proteínas ou a ligação peptídica entre diferentes aminoácidos. As pequenas diferenças na estrutura de cada uma dessas proteases lhes conferem a especificidade de substrato, assim cada uma desempenha uma função diferente no organismo.

As moléculas grandes de proteínas contêm normalmente mais de uma cadeia polipeptídica

As mesmas ligações não covalentes que permitem que uma cadeia polipeptídica se enovele em uma conformação específica também promovem a ligação de proteínas umas às outras, produzindo estruturas celulares maiores. Qualquer região na superfície de uma proteína que interaja com outra molécula por uma série de ligações não covalentes é denominada *sítio de ligação.* Uma proteína pode conter sítios de ligação para diferentes moléculas, grandes e pequenas. Caso o sítio de ligação de uma proteína reconheça a superfície de uma segunda proteína, a ligação dessas duas cadeias polipeptídicas irá originar uma molécula proteica maior, cuja estrutura quaternária possui geometria precisamente definida. Cada cadeia polipeptídica nessa proteína é chamada de **subunidade**. Cada uma dessas subunidades pode conter mais de um domínio, uma porção da cadeia polipeptídica que se enovela de forma independente.

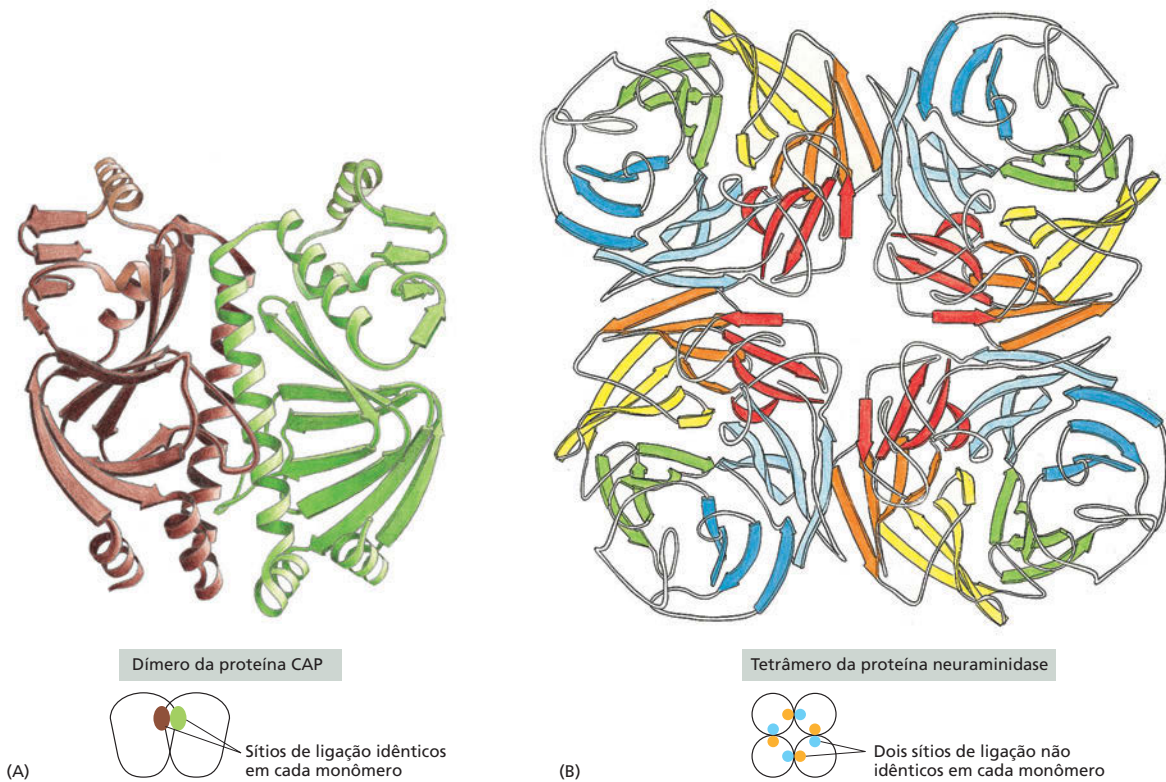



Figura 4-19 Muitas moléculas proteicas contêm múltiplas cópias de uma mesma subunidade. (A) Um dímero simétrico. A proteína CAP existe como um complexo de duas cadeias polipeptídicas idênticas (ver também Figura 4-16). (B) Um tetrâmero simétrico. A enzima neuraminidase é um anel composto de quatro subunidades da mesma cadeia polipeptídica. Para (A) e (B), um pequeno esquema abaixo das suas estruturas enfatiza como o uso repetido do mesmo sítio de ligação forma a estrutura. Em (A), o uso do mesmo sítio de ligação em cada monômero (representado pelas elipses em *marrom* e *verde*) induz à formação de um dímero simétrico. Em (B), um par de sítios de ligação não idênticos (representados pelos círculos em *laranja* e *azul*) induz à formação de um tetrâmero simétrico.

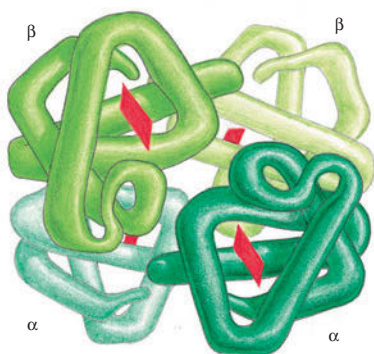



Figura 4-20 Algumas proteínas são formadas pelo conjunto simétrico de duas subunidades diferentes. A hemoglobina, proteína abundante em hemácias, contém duas cópias da subunidade α-globina e duas da subunidade β-globina. Cada uma das quatro cadeias polipeptídicas contém um grupo heme (retângulo *vermelho)*, o sítio de ligação do oxigênio (O_2). Assim, cada molécula de hemoglobina é capaz de ligar-se a quatro moléculas de O_2.

No caso mais simples, duas cadeias polipeptídicas idênticas e enoveladas se ligam uma à outra formando um complexo simétrico de duas subunidades proteicas (chamado de *dímero*) mantidas unidas pela interação dos dois sítios de ligação iguais. A proteína CAP encontrada em células bacterianas é um dímero (**Figura 4-19A**) formado por duas cópias idênticas da subunidade mostrada anteriormente na Figura 4-16. Muitos outros complexos proteicos simétricos, formados por múltiplas cópias de uma mesma cadeia polipeptídica, são comumente encontrados nas células. A enzima *neuraminidase*, por exemplo, é formada por quatro subunidades idênticas unidas como um anel (Figura 4-19B).

Outras proteínas contêm dois ou mais tipos de cadeias polipeptídicas. A *hemoglobina,* a proteína carreadora de oxigênio nas hemácias, é um exemplo muito estudado (**Figura 4-20**). Essa proteína contém duas subunidades idênticas de α-globina e outras duas subunidades idênticas de β-globina, simetricamente arranjadas. Diversas proteínas são compostas por múltiplas subunidades, podendo ser muito grandes (**Animação 4.5**).

As proteínas podem agregar-se formando filamentos, lâminas ou esferas

Proteínas podem formar conjuntos ainda maiores do que os já discutidos até aqui. Da maneira mais simples, uma cadeia de moléculas proteicas idênticas

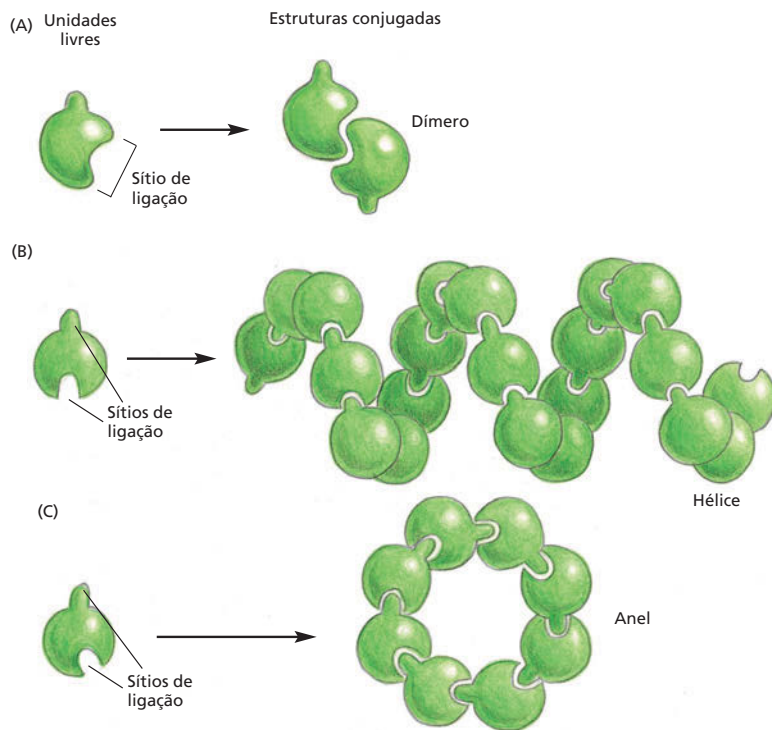



Figura 4-21 Proteínas podem conjugar-se em estruturas complexas. (A) Uma proteína com apenas um sítio de ligação pode formar um dímero com outra proteína idêntica. (B) Proteínas idênticas com dois sítios de ligação diferentes frequentemente formarão um longo filamento helicoidal. (C) Se os dois sítios de ligação estiverem dispostos apropriadamente, as subunidades proteicas formarão um anel fechado, e não uma hélice (ver também a Figura 4-19B).

pode ser formada se o sítio de ligação de uma proteína for complementar à outra região na superfície de outra molécula do mesmo tipo. Como cada proteína se liga à molécula vizinha da mesma maneira, essas cadeias assumem o arranjo de hélice e podem estender-se indefinidamente (**Figura 4-21**). Esse tipo de arranjo pode produzir uma proteína filamentosa. Um filamento de actina, por exemplo, é uma longa estrutura helicoidal formada por muitas moléculas de actina (**Figura 4- 22**). A actina é extremamente abundante em células eucarióticas, onde forma um dos maiores sistemas de filamentos do citoesqueleto (discutido no Capítulo 17). Outros tipos de proteínas se associam formando lâminas ou tubos, como nos microtúbulos de citoesqueleto (**Figura 4-23**), ou formas esféricas, como as constituintes dos envelopes proteicos das partículas virais (**Figura 4-24**).

Estruturas grandes, como vírus e ribossomos, são construídas a partir de uma mistura de um ou mais tipos de proteínas, além de moléculas de DNA ou RNA. Essas estruturas podem ser isoladas, purificadas e dissociadas em suas macromoléculas constituintes. Frequentemente, é possível misturar esses constituintes isolados e vê-los se arranjando espontaneamente na sua forma original. Isso demonstra que toda informação necessária para a formação dessas estruturas complexas está contida em suas macromoléculas. Experimentos desse tipo mostram que muitas das estruturas de uma célula são auto-organizáveis: se as proteínas necessárias forem produzidas na quantidade necessária, as estruturas apropriadas serão formadas.

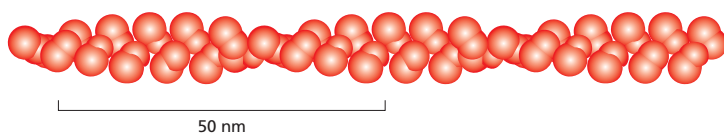
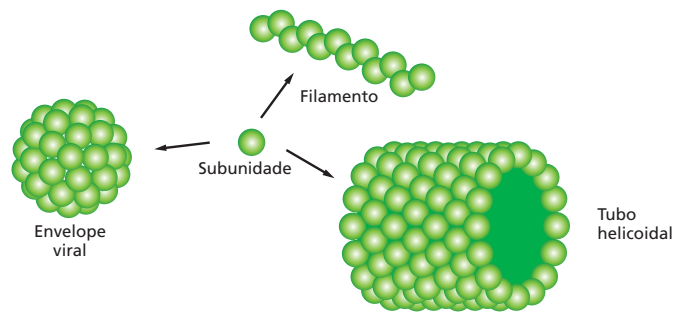



Figura 4-22 Um filamento de actina é composto por subunidades proteicas idênticas. O arranjo helicoidal das moléculas de actina frequentemente contém milhares de moléculas e se estende por micrômetros na célula.

Figura 4-23 Subunidades proteicas podem conjugar-se formando um filamento, um tubo ou uma esfera.

Alguns tipos de proteínas possuem formas fibrosas alongadas

Muitas proteínas discutidas até aqui são **proteínas globulares**, nas quais a cadeia polipeptídica se enovela em uma estrutura compacta, como uma bola de superfície irregular. Enzimas tendem a ser proteínas globulares: embora a maioria possua formatos grandes e complicados, com múltiplas subunidades, elas possuem, em sua maioria, uma estrutura quaternária de forma arredondada (ver Figura 4-9). Em contraste, outras proteínas para atuar nas células precisam atravessar longas distâncias. Essas proteínas geralmente possuem estrutura tridimensional simples e alongada e são chamadas de **proteínas fibrosas**.

Uma grande classe de proteínas fibrosas intracelulares se assemelha à α-queratina, estrutura que já mencionamos. Filamentos de queratina são extremamente estáveis: estruturas como cabelo, chifre e unhas são compostos principalmente por essa proteína. Uma molécula de α-queratina é um dímero de subunidades idênticas, com uma longa α-hélice de cada subunidade formando uma espira enrolada (ver Figura 4-13). Essas regiões de espiras enroladas são flanqueadas por domínios globulares contendo sítios de ligacão que permitem a essas moléculas a formação de estruturas de *filamentos intermediários* – um componente do citoesqueleto que cria um arcabouço estrutural no interior da célula (discutido no Capítulo 17).

Proteínas fibrosas são especialmente abundantes no meio extracelular, onde formam a *matriz extracelular* coloidal que ajuda as células a permanecerem unidas formando tecidos. Essas proteínas são secretadas pelas células no meio que as circunda, onde são mantidas juntas como lâminas ou longas fibras. O *colágeno* é a mais abundante dessas proteínas fibrosas em tecidos animais. A molécula de colágeno é formada por três longas cadeias polipeptídicas, cada uma contendo o aminoácido apolar glicina a cada três resíduos. Essa estrutura regular permite que as cadeias se enrolem formando uma longa hélice tripla com os resíduos de glicina localizados no seu centro (**Figura 4-25A**). Muitas moléculas de colágeno se ligam lado a lado ou uma após a outra, criando uma rede entrelaçada e extremamente forte de fibras, que mantém tecidos unidos como descrito no Capítulo 19.

Em contraste com o colágeno está outra proteína da matriz extracelular, a *elastina*. Moléculas de elastina são formadas por cadeias polipeptídicas relativamente desestruturadas ligadas covalentemente a outras moléculas formando uma rede elástica e frouxa. Essas fibras elásticas permitem à pele e a outros tecidos, como artérias e pulmão, esticarem e retornarem ao tamanho original sem rasgar. Como ilustrado na Figura 4-25B, essa elasticidade se deve à capacidade de cada molécula proteica de retornar à sua conformação original toda vez que for esticada.

Figura 4-24 **Muitos capsídeos virais são conjuntos mais ou menos esféricos de proteínas.** Esses capsídeos são poliedros formados a partir de diversas cópias de um pequeno conjunto de subunidades proteicas. O ácido nucleico do vírus (DNA ou RNA) fica encapsulado por essa estrutura. A estrutura do vírus SV40 de símios, mostrada aqui, foi determinada por cristalografia por raios X e é conhecida em detalhes atômicos. (Cortesia de Robert Grant, Stephan Crainic e James M. Hogle.)

As proteínas extracelulares são normalmente estabilizadas por ligações covalentes cruzadas

Muitas proteínas podem estar ligadas à face externa da membrana plasmática ou fazer parte da matriz extracelular. Essas proteínas estão expostas diretamente às condições extracelulares. Para ajudar a manter suas estruturas, as cadeias poli-

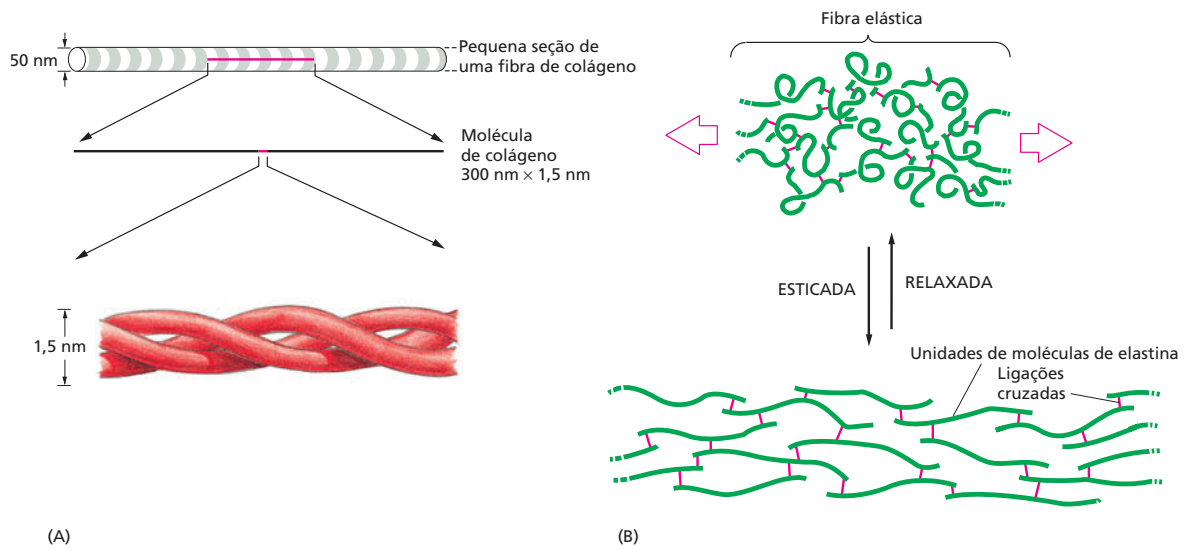



Figura 4-25 Colágeno e elastina são proteínas fibrosas abundantes. (A) Colágeno é uma hélice tripla formada por três cadeias de proteínas estendidas e enroladas juntas. Muitas moléculas de colágeno são unidas no espaço extracelular, formando as fibras de colágeno (parte superior) que possuem a força tensora igual à do aço. As listras da fibra de colágeno se devem à repetição regular das moléculas de colágeno dentro da fibra. (B) Cadeias polipeptídicas de elastina possuem ligações cruzadas que as mantêm unidas, formando uma rede elástica. Cada molécula de elastina assume uma conformação mais estendida quando a fibra é esticada e retorna à sua formação original espontaneamente quando a fibra é relaxada.

peptídicas dessas proteínas são geralmente estabilizadas por ligações covalentes cruzadas. Essas ligações podem unir dois aminoácidos de uma mesma proteína ou ainda conectar diferentes cadeias polipeptídicas de uma proteína constituída de várias subunidades. A ligação covalente cruzada mais comum nas proteínas são as pontes dissulfeto. As **pontes dissulfeto** (também chamadas de *ligações S-S*) se formam enquanto as proteínas são exportadas da célula. Sua formação é catalisada no interior do retículo endoplasmático por uma enzima especial que liga dois grupos –SH de cadeias laterais de cisteínas adjacentes na proteína enovelada (Figura 4-26). As pontes dissulfeto não alteram a conformação de uma proteína, e sim reforçam a estrutura na sua conformação mais favorável. Por exemplo, a lisozima – enzima presente em lágrimas, saliva e outras secreções que é capaz de dissolver a parede celular bacteriana – mantém sua atividade bactericida por um longo intervalo de tempo, pois é estabilizada por essas ligações cruzadas.

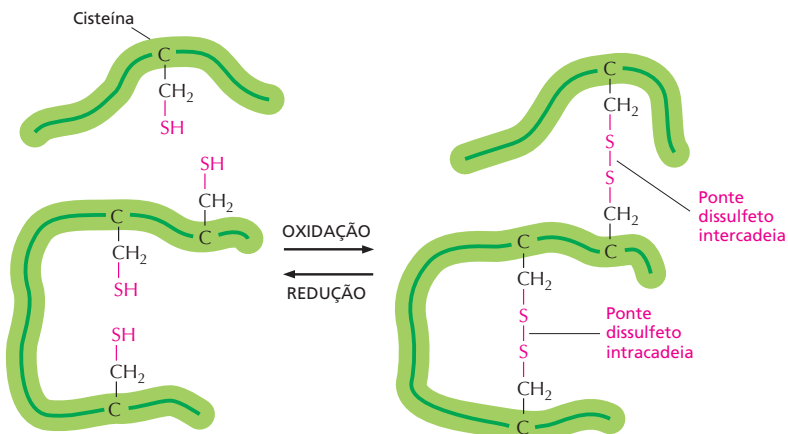



Figura 4-26 Pontes dissulfeto ajudam a estabilizar a conformação nativa de uma proteína. Esse diagrama ilustra como pontes covalentes dissulfeto se formam entre as cadeias laterais de resíduos de cisteína adjacentes. Conforme indicado, essas ligações cruzadas podem unir duas partes de uma mesma cadeia polipeptídica ou duas cadeias diferentes. Como a energia necessária para romper uma ligação covalente é muito maior do que a energia para romper ligações não covalentes (ver Tabela 2-1, p. 47), uma ponte dissulfeto possui um grande efeito estabilizador em uma proteína (**Animação 4.6**).

As pontes dissulfeto geralmente não se formam no citosol, onde a alta concentração de agentes redutores converteria as pontes novamente em grupos –SH de cisteínas. Aparentemente, as proteínas não necessitam desse tipo de reforço estrutural no ambiente relativamente ameno do interior da célula.

COMO AS PROTEÍNAS FUNCIONAM

QUESTÃO 4-5

O cabelo é composto principalmente por fibras de queratina. Cada uma das fibras de queratina é ligada a outras (ligações cruzadas) por meio de diversas pontes dissulfeto. Se um cabelo crespo for tratado com agentes redutores suaves, que rompem algumas dessas ligações cruzadas, e então alisado e oxidado novamente, ele permanecerá liso. Desenhe um diagrama ilustrando os diferentes estágios desse processo químico e mecânico em nível molecular, enfocando as pontes dissulfeto. O que aconteceria se o cabelo fosse tratado com um agente redutor forte, capaz de romper todas as pontes dissulfeto?

Proteínas não são um material inerte. Suas diferentes sequências de aminoácidos originam uma grande variedade de formas, cada uma com constituição única de grupos químicos em sua superfície topográfica. A conformação de uma proteína lhe confere função específica, com base nas suas propriedades químicas. É essa união entre estrutura, química e atividade que dota a proteína com sua extraordinária habilidade de orquestrar os processos dinâmicos que ocorrem em uma célula viva.

Para proteínas, forma e função estão inexoravelmente ligadas. Contudo, a questão fundamental permanece: como as proteínas realizam suas funções? Nesta parte do capítulo, veremos que a atividade das proteínas depende da sua especificidade de ligação a outras moléculas, permitindo que ajam como catalisadoras, receptoras de sinais e pequenos motores moleculares. Os exemplos que revisaremos aqui não cobrem todo o repertório funcional das proteínas. No entanto, as funções especializadas de muitas proteínas que você encontrará ao longo deste livro se baseiam em princípios similares aos aqui descritos.

Todas as proteínas se ligam a outras moléculas

As propriedades biológicas de uma molécula proteica dependem da sua interação física com outras moléculas. Anticorpos se ligam a vírus ou bactérias como um sinal para os sistemas de defesa do corpo, a enzima hexocinase liga glicose e ATP para então catalisar a reação entre eles, moléculas de actina se ligam umas às outras para formar longos filamentos, e assim por diante. De fato, todas as proteínas aderem, ou se ligam, a outras moléculas. Em alguns casos, essas ligações são muito fortes; em outros, elas são fracas e de curta duração. Conforme visto no Capítulo 3, a afinidade de uma enzima pelo seu substrato se reflete no seu valor de K_M: quanto menor o valor de K_M, maior a força da ligação. Independentemente da força, a ligação de uma proteína a outra molécula biologica sempre apresenta grande *especificidade:* cada proteína pode ligar-se a uma ou a poucas moléculas dentre as milhares a que está exposta. Qualquer substância que está ligada a uma proteína – seja ela um íon, uma pequena molécula ou uma macromolécula – é chamada de **ligante** da proteína (do latim *ligare,* "ligar").

A habilidade da ligação seletiva e a alta afinidade ao ligante é dependente da formação de um conjunto de ligações fracas não covalentes – pontes de hidrogênio, ligações iônicas e interações de van der Waals – e de interações hidrofóbicas favoráveis (ver Painel 2-7, p. 76-77). Cada ligação, individualmente, é fraca, e uma interação efetiva requer que várias dessas ligações se formem simultaneamente. Isso apenas é possível quando a superfície da molécula do ligante se encaixa perfeitamente na proteína, como uma mão em uma luva (**Figura 4-27**).

Quando as superfícies da proteína e do ligante possuem pouca similaridade para o encaixe, apenas poucas ligações não covalentes poderão ser formadas, e as duas moléculas se dissociam rapidamente. É isso que evita associações incorretas e indesejadas entre pares de moléculas. Por outro lado, ao se formarem muitas ligações não covalentes, a associação entre moléculas pode perdurar por grandes intervalos de tempo. Interações fortes ocorrem sempre que uma função biológica requeira a manutenção de moléculas firmemente associadas por longos períodos para exercer uma função biológica, por exemplo, quando um grupo de macromoléculas é mantido unido para formar uma estrutura como o ribossomo.

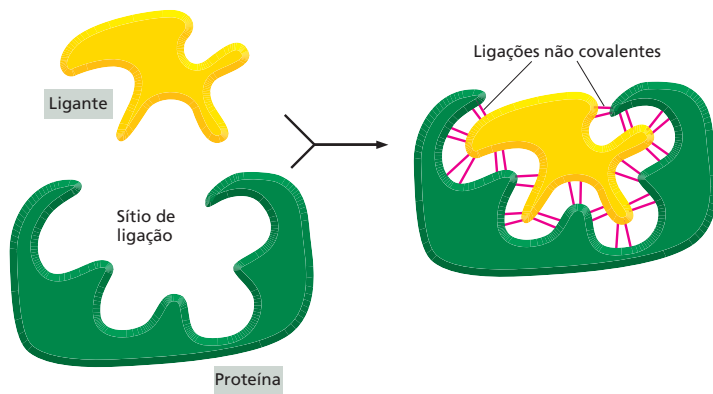



Figura 4-27 A ligação de uma proteína a outra molécula é extremamente seletiva. Muitas ligações fracas são necessárias para que uma proteína se ligue firmemente a uma segunda molécula (um ligante). O ligante deve encaixar-se perfeitamente no sítio de ligação, como a mão em uma luva; assim, um grande número de ligações não covalentes pode ser formado entre a proteína e o ligante.

A região de proteína que se associa ao ligante é chamada de **sítio de ligação** e geralmente consiste em uma cavidade na superfície da proteína, formada por um arranjo específico de aminoácidos. Esses aminoácidos podem pertencer a regiões distantes da cadeia polipeptídica que são aproximadas pelo enovelamento da proteína (**Figura 4-28**). Outras regiões na superfície da proteína podem conter sítios de ligação para outros ligantes, permitindo que sua atividade seja regulada, como será visto adiante. Outras partes da proteína podem ser necessárias para atrair ou fixar essa proteína em um local específico na célula, por exemplo, as α-hélices hidrofóbicas de uma proteína transmembrana permitem que ela esteja inserida na bicamada lipídica (como discutido no Capítulo 11).

Embora os aminoácidos do interior da proteína não façam contato direto com o ligante, eles fornecem o arcabouço, o "esqueleto", que confere à superfície os seus contornos e propriedades químicas. Mesmo pequenas mudanças nos aminoácidos do interior de uma proteína podem alterar a sua forma tridimensional e destruir a sua capacidade de exercer a sua função.

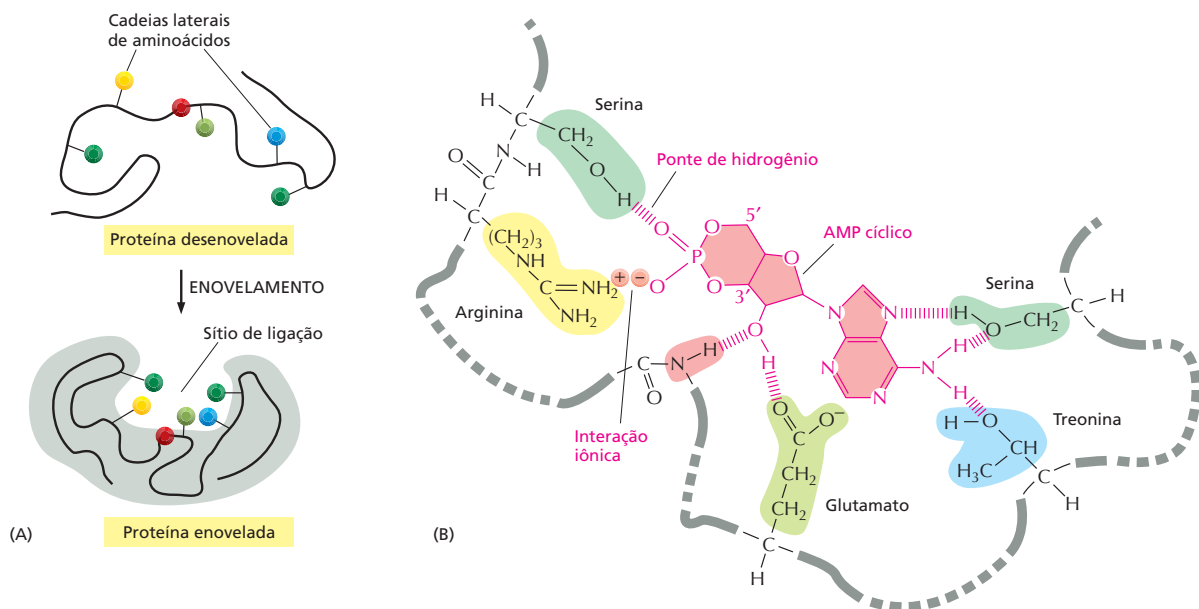



Figura 4-28 Sítios de ligações permitem a interação específica entre proteína e ligante. (A) O enovelamento de uma cadeia polipeptídica cria fendas ou cavidades na superfície da proteína. Essas fendas contêm um conjunto de aminoácidos dispostos de tal maneira que a formação de ligações não covalentes ocorre apenas com ligantes específicos. (B) Visão mais detalhada de um sítio de ligação mostrando as pontes de hidrogênio e as interações iônicas entre a proteína e o seu ligante (nesse exemplo, o ligante é o cAMP – AMP cíclico, mostrado em *rosa*).

Os sítios de ligação de anticorpos são especialmente versáteis

Todas as proteínas precisam associar-se aos seus ligantes específicos para exercerem suas funções. Essa capacidade de ligação parece ser particularmente mais desenvolvida para proteínas da família dos anticorpos: nossos organismos possuem a capacidade de produzir anticorpos únicos, capazes de reconhecer e ligar fortemente estruturas de qualquer molécula imaginável.

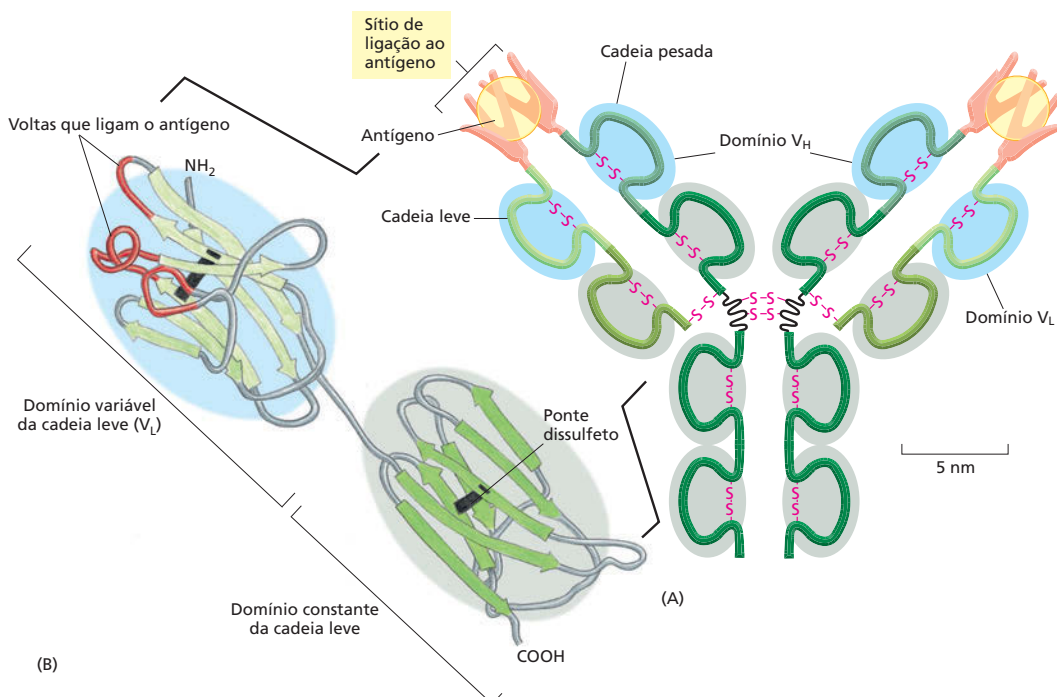
Anticorpos, ou imunoglobulinas, são proteínas produzidas pelo sistema imune em resposta a moléculas estranhas ao organismo, como as da superfície de um microrganismo invasor. Cada anticorpo se liga firmemente a um alvo em particular, promovendo sua inativação direta ou marcando-o para degradação. Um anticorpo reconhece seu alvo (chamado de **antígeno**) com notável especificidade, e, havendo bilhões de possíveis antígenos a que uma pessoa pode estar exposta, devemos ser capazes de produzir bilhões de diferentes anticorpos.

Anticorpos são moléculas em forma de "Y" com dois sítios de ligações idênticos e complementares a uma pequena porção da superfície da molécula do antígeno. Examinando detalhadamente os sítios de ligação para o antígeno, percebe-se que são formados por diversas voltas da cadeia polipeptídica que se destacam de um par de domínios proteicos justapostos (Figura 4-29). A sequência de aminoácidos nessas voltas pode ser modificada por mutações, sem que haja alterações na estrutura básica do anticorpo. Uma grande diversidade de sítios de ligação pode ser gerada modificando apenas o comprimento da sequência de aminoácido em cada volta, o que explica a diversidade de anticorpos que pode ser gerada (Animação 4.7).

Com essa combinação ímpar de especificidade e diversidade, os anticorpos são não apenas indispensáveis no combate a infecções, mas também são de grande valor no uso laboratorial, onde são utilizados na purificação e no estudo de outras moléculas (Painel 4-3, p. 144-145).

As enzimas são catalisadores potentes e altamente específicos

Para muitas proteínas, a ligação a outra molécula é sua única função. Uma molécula de anticorpo precisa apenas ligar-se à sua molécula-alvo na super-

Figura 4-29 Anticorpos são moléculas em forma de "Y" e possuem dois sítios de ligação idênticos para seu antígeno, um em cada braço do Y. (A) Desenho esquemático de uma molécula típica de anticorpo. A proteína é composta por quatro cadeias polipeptídicas (duas cadeias polipeptídicas pesadas idênticas e duas cadeias leves e menores, também idênticas) mantidas unidas por pontes dissulfeto. Cada cadeia é constituída por diferentes domínios, aqui destacados em *azul* ou *cinza*. O sítio de ligação ao antígeno é formado no ponto em que um domínio variável da cadeia pesada (V_H) e um domínio variável da cadeia leve (V_L) se aproximam. São esses domínios que diferem, tanto na sequência quanto na estrutura, entre os diferentes anticorpos. (B) Desenho no modelo de fitas de uma cadeia leve mostrando as partes do domínio V_L mais intimamente envolvidas na ligação ao antígeno (*vermelho*). Essa estrutura constitui metade das voltas que cercam a molécula do antígeno mostrado em (A).

fície de uma bactéria ou de um vírus para executar seu trabalho; uma molécula de actina precisa apenas associar-se a outras moléculas de actina para formar um filamento. Há outras proteínas, entretanto, nas quais a ligação à outra molécula é apenas o primeiro passo da sua função. Esse é o caso das enzimas, uma grande e importante classe de proteínas. Essas moléculas notáveis desempenham quase todas as transformações químicas que ocorrem nas células. Enzimas se ligam a um ou mais ligantes, chamados de substratos, e os convertem em produtos modificados quimicamente, repetindo essa ação muitas e muitas vezes, com extrema rapidez. Conforme visto no Capítulo 3, as enzimas aceleram reações, frequentemente com um fator de um milhão ou mais, sem sofrer alterações – ou seja, enzimas agem como catalisadores que permitem à célula formar ou quebrar ligações covalentes. A catálise de grupos organizados de reações químicas cria e mantém a célula, tornando a vida possível.

As enzimas podem ser agrupadas em classes funcionais, com base no tipo de reações químicas que catalisam (**Tabela 4-1**). Cada tipo de enzima é altamente específico, catalisando apenas um tipo de reação. A *hexocinase* adiciona um grupo fosfato à molécula D-glicose, e não ao seu isômero óptico L-glicose; a *trombina,* enzima de coagulação sanguínea, cliva um tipo de proteína sanguínea especificamente entre uma arginina e uma glicina, e em nenhum outro lugar. Como discutido em detalhes no Capítulo 3, enzimas geralmente trabalham em conjunto, sendo o produto de uma o substrato da seguinte. O resultado é uma intrincada rede de *vias metabólicas* que fornecem energia à célula, gerando muitas moléculas grandes e pequenas de que a célula necessita.

QUESTÃO 4-6

Explique como uma enzima (como a hexocinase, mencionada no texto) consegue distinguir substratos (nesse caso, D-glicose) dos seus isômeros ópticos (L-glicose). (Dica: lembre-se de que um átomo de carbono forma quatro ligações simples arranjadas como um tetraedro e que isômeros ópticos são imagens especulares um do outro. Desenhe o substrato como um tetraedro e seus quatro diferentes vértices e então desenhe sua imagem especular. Usando esse desenho, indique por que apenas um composto pode ligar-se ao sítio ativo de uma enzima.)

A lisozima ilustra como uma enzima funciona

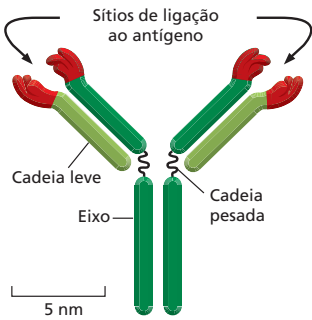
Para explicar como as enzimas catalisam reações químicas, usaremos como exemplo a lisozima – uma enzima que age como um antibiótico natural na clara do ovo, na saliva, nas lágrimas e em outras secreções. A lisozima cliva as cadeias polissacarídicas que formam a parede celular de bactérias. Como a célula bacteriana está sobre forte pressão osmótica, a quebra, mesmo que de um pequeno

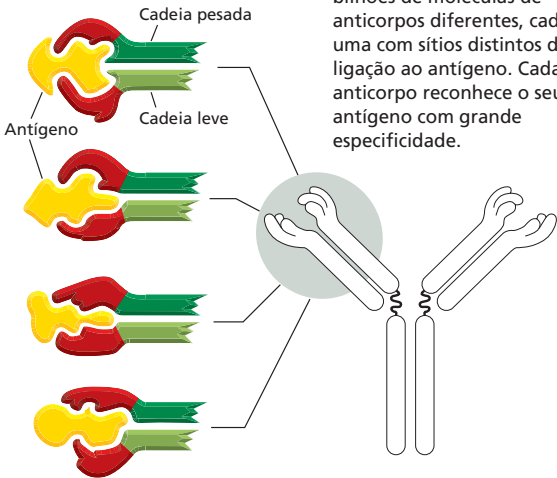
TABELA 4-1 Classes funcionais enzimáticas mais comuns

Classe enzimática	Função bioquímica
Hidrolase	Denominação geral para enzimas que catalisam reações de clivagem hidrolítica.
Nuclease	Promove a quebra de ácidos nucleicos por hidrólise das ligações entre nucleotídeos.
Protease	Promove a quebra de proteínas pela hidrólise das ligações peptídicas entre os aminoácidos.
Sintase	Denominação geral usada para enzimas que sintetizam moléculas em reações anabólicas, pela condensação de duas moléculas.
Isomerase	Catalisa o arranjo de ligações em uma molécula.
Polimerase	Catalisa reações de polimerização, como a síntese de DNA e RNA.
Cinase	Catalisa a adição de grupos fosfato a moléculas. As proteína-cinases são um importante grupo de cinases que adicionam grupos fosfato a outras proteínas.
Fosfatase	Catalisam a remoção por hidrólise de grupos fosfatos de moléculas.
Óxido-redutase	Denominação geral para enzimas que catalisam reações onde uma molécula é oxidada enquanto outra é reduzida. Enzimas desse tipo são frequentemente chamadas de oxidases, redutases ou desidrogenases.
ATPase	Catalisam a hidrólise do ATP. Muitas proteínas que desempenham outros papéis possuem atividade ATPase como parte das suas funções, por exemplo, proteínas motoras, como miosina, e proteínas de transporte transmembrana, como a bomba de Na^+/K^+.

Os nomes das enzimas frequentemente são terminados em "-ase", com poucas exceções, como pepsina, tripsina, trombina, lisozima, etc., que foram descobertas e nomeadas antes de os nomes serem convencionados no final do século XIX. O nome comum da enzima geralmente indica o seu substrato e a natureza da reação catalisada. Por exemplo, a enzima citrato-sintase catalisa a síntese de citrato pela reação entre acetil-CoA e oxalacetato.

PAINEL 4-3 Produzindo e utilizando anticorpos

A MOLÉCULA DE ANTICORPO

Anticorpos são proteínas que se ligam muito firmemente aos seus alvos (antígenos). Essas moléculas são produzidas em vertebrados como defesa contra infecções. Cada molécula de anticorpo é formada por duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas, também idênticas; assim, os dois sítios de ligação ao antígeno são iguais.

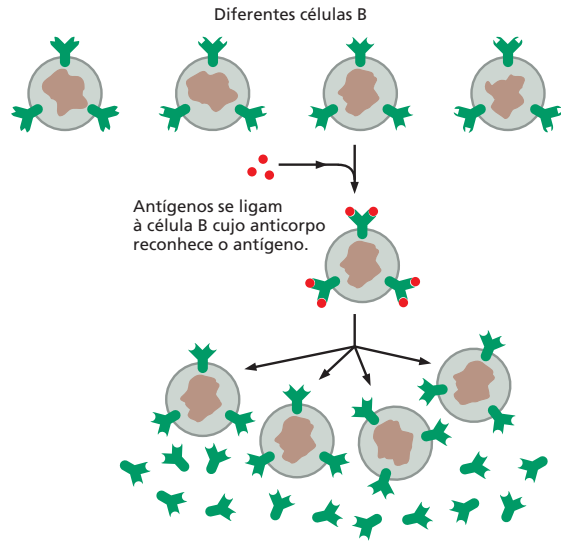
ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO

Um animal pode produzir bilhões de moléculas de anticorpos diferentes, cada uma com sítios distintos de ligação ao antígeno. Cada anticorpo reconhece o seu antígeno com grande especificidade.

ANTICORPOS NOS DEFENDEM CONTRA INFECÇÕES

Agregados de anticorpos e antígenos são ingeridos por fagócitos.

Proteínas especiais do sangue degradam vírus e bactérias revestidos por anticorpos.

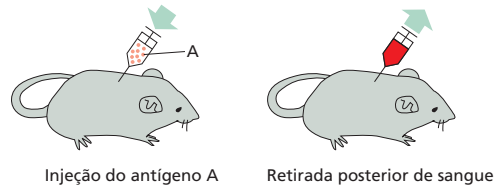
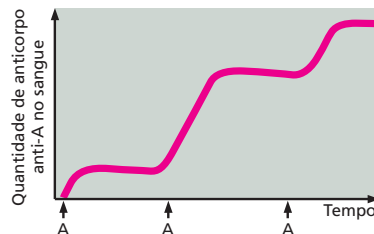
CÉLULAS B PRODUZEM ANTICORPOS

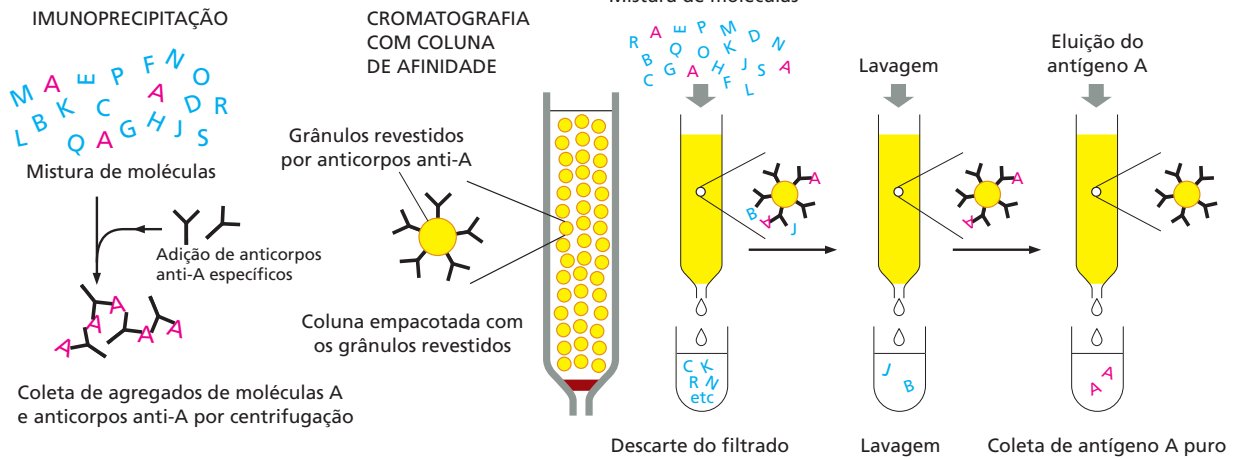
Anticorpos são produzidos por um dos tipos de células brancas do sangue, chamadas de linfócitos B, ou células B. Cada célula B possui anticorpos diferentes ligados à superfície de suas membranas, servindo como receptores para reconhecer antígenos específicos. Quando um antígeno se liga ao receptor, a célula B é estimulada a se dividir e secretar grandes quantidades do mesmo anticorpo que possui na sua superfície, mas na forma solúvel.

Células B são estimuladas a produzir e secretar anticorpos iguais aos da sua superfície.

PRODUZINDO ANTICORPOS EM ANIMAIS

Anticorpos podem ser produzidos em laboratório injetando um antígeno A em um animal (geralmente, camundongo, coelho, ovelha ou cabra).

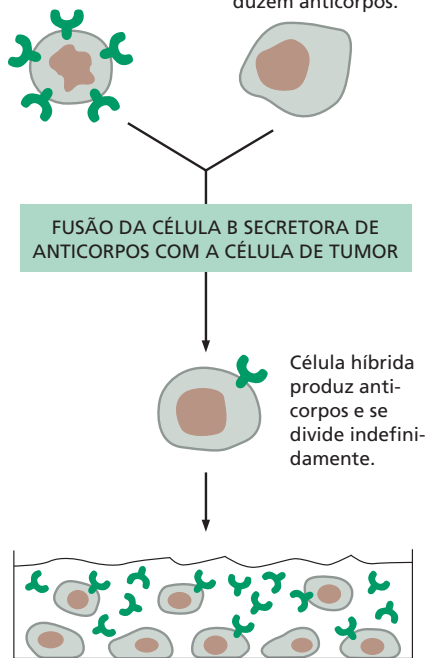
Injeção do antígeno A

Retirada posterior de sangue

Injeções repetidas do mesmo antígeno em intervalos de várias semanas estimulam as células B a secretarem grandes quantidades de anticorpos anti-A na corrente sanguínea.

Como diferentes células B são estimuladas pelo antígeno A, haverá uma variedade de anticorpos anti-A na corrente sanguínea, cada uma com especificidade de ligação ao antígeno A ligeiramente diferente.

USANDO ANTICORPOS PARA PURIFICAR MOLÉCULAS

ANTICORPOS MONOCLONAIS

Grandes quantidades de um único tipo de anticorpo podem ser obtidas pela fusão de uma célula B (retirada de um animal injetado com antígeno A) com uma célula de tumor. A célula híbrida resultante se divide indefinidamente e secreta anticorpos anti-A de um único tipo (monoclonais).

A célula B de um animal injetado com antígeno A produz anticorpos anti-A, mas não se divide indefinidamente.

Células de tumor obtidas de uma cultura de células se dividem indefinidamente, mas não produzem anticorpos.

USANDO ANTICORPOS COMO MARCADORES MOLECULARES

Anticorpos específicos contra antígeno A

Ligação a um marcador fluorescente, partícula de ouro ou outro marcador especial

Anticorpos marcados

DETECÇÃO MICROSCÓPICA

Anticorpos fluorescentes se ligam ao antígeno A no tecido e são detectados por fluorescência no microscópio. Aqui, o antígeno é a pectina, presente na parede celular de um corte histológico de um tecido vegetal.

Parede celular

Anticorpos marcados com partículas de ouro se ligam ao antígeno A no tecido e são detectados no microscópio eletrônico. O antígeno é a pectina, presente na parede celular de uma única célula vegetal.

DETECÇÃO BIOQUÍMICA

O antígeno A é separado de outras moléculas por eletroforese.

A incubação com anticorpos marcados que se ligam ao antígeno A permite que a posição do antígeno seja determinada.

O segundo anticorpo marcado (*azul*) se liga ao primeiro anticorpo (*preto*).

Antígeno

Nota: Em todos os casos, a sensibilidade da técnica pode ser aumentada com o uso de várias camadas de anticorpos. Esse método de "sanduíche" permite que um pequeno número de moléculas de antígeno seja detectado.

número dessas cadeias, causa a ruptura da parede celular e a lise da bactéria. A lisozima é uma proteína relativamente pequena e estável, facilmente isolada em grandes quantidades. Por essa razão, ela já foi intensamente estudada e foi a primeira enzima cuja estrutura foi determinada em detalhes atômicos por cristalografia por raios X.

A reação catalisada pela lisozima é uma hidrólise: a enzima adiciona uma molécula de água na ligação simples entre dois açúcares adjacentes na cadeia polissacarídica, causando a quebra da ligação. Essa reação é energeticamente favorável porque a energia livre da cadeia clivada é menor do que a energia livre da cadeia intacta. Entretanto, polissacarídeos podem permanecer por anos na água sem serem hidrolisados. Isso ocorre porque há uma barreira energética nesse tipo de reação chamada de *energia de ativação* (discutido no Capítulo 3). Para uma molécula de água clivar a ligação entre dois açúcares, a molécula do polissacarídeo precisa estar distorcida em um ângulo específico – **estado de transição** –, no qual os átomos ao redor da ligação possuem geometria e distribuição eletrônica alteradas. Para gerar essa distorção, uma quantidade de energia precisa ser fornecida por colisões moleculares aleatórias. Em uma solução aquosa, à temperatura ambiente, a energia das colisões raramente excede à da energia de ativação; consequentemente, a hidrólise será extremamente lenta, se ocorrer.

É nesse ponto que as enzimas atuam. Como qualquer enzima, a lisozima possui um sítio específico de ligação em sua superfície, chamado de **sítio ativo**, que reconhece o contorno da molécula que serve como seu substrato. É no sítio ativo que ocorre a catalise da reação química. Como seu substrato é um polímero, seu sítio ativo é uma longa cavidade que comporta seis açúcares adjacentes ao mesmo tempo. Quando o polissacarídeo se liga formando o complexo enzima-substrato, a enzima cliva o polissacarídeo pela adição de uma molécula de água entre uma de suas ligações açúcar-açúcar. As cadeias clivadas são, então, rapidamente liberadas do sítio ativo, deixando a enzima livre para outros ciclos de reação (**Figura 4-30**).

A química que está por trás do processo de ligação da lisozima ao seu substrato é a mesma do processo de ligação dos anticorpos – a formação de múltiplas ligações não covalentes. Entretanto, a lisozima segura seu substrato polissacarídico de forma que um dos dois açúcares da ligação a ser clivada tem sua conformação normal, mais estável, distorcida. A ligação a ser clivada é mantida próxima às cadeias laterais de dois aminoácidos ácidos: glutamato e aspartato, presentes no interior do sítio ativo.

Figura 4-30 A lisozima cliva cadeias polissacarídicas. (A) Representação esquemática da enzima lisozima (denominada E) que catalisa a quebra de uma cadeia polissacarídica, seu substrato (denominado S). A enzima se liga ao substrato formando o complexo enzima-substrato (ES) e então catalisa a quebra de uma ligação covalente específica na cadeia principal do polissacarídeo, formando o complexo enzima-produto (EP), que se dissocia rapidamente. A liberação das cadeias clivadas (os produtos P) deixa a enzima livre para atuar sobre outra molécula de substrato. (B) Modelo de preenchimento espacial da molécula de lisozima ligada a uma curta cadeia polissacarídica, antes da sua clivagem. (B, cortesia de Richard J. Feldmann.)

Figura 4-31 No sítio ativo da lisozima, ligações são curvadas e clivadas. Os desenhos nos cantos superiores esquerdo e direito mostram o substrato e os produtos livres respectivamente. Os painéis abaixo mostram os eventos sequenciais no sítio ativo da enzima durante a clivagem de uma ligação açúcar-açúcar. Note a mudança na conformação do açúcar D no complexo enzima-substrato em comparação com a sua conformação no substrato livre; essa conformação favorece a formação do estado de transição. A reação, assim como a estrutura da lisozima ligada ao seu produto, é mostrada na **Animação 4.8** e na **Animação 4.9**. (Com base em D. J. Vocadlo *et al.*, *Nature* 412:835-838, 2001. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

No microambiente do sítio ativo da lisozima, são criadas condições que reduzem significativamente a energia de ativação necessária para que ocorra a hidrólise. A **Figura 4-31** mostra os principais intermediários dessa reação catalisada enzimaticamente.

1. A enzima estica seu substrato (nesse exemplo, um polissacarídeo formado por seis açúcares) pela distorção de algumas ligações químicas de um dos açúcares; assim, a forma desse açúcar é modificada, lembrando a forma característica do estado de transição formado durante a reação.
2. O aspartato, carregado negativamente, reage com o átomo de carbono C1 do açúcar distorcido, clivando a ligação açúcar-açúcar e deixando o aspartato covalentemente ligado ao local da clivagem da ligação.
3. Uma molécula de água, ajudada pelo glutamato de carga negativa, interage com o átomo de carbono C1, liberando o aspartato e completando o processo de hidrólise.

Toda essa reação química, desde a ligação inicial do substrato polissacarídico à superfície da enzima até a liberação das cadeias clivadas, ocorre milhões de vezes mais rapidamente do que ocorreria na ausência da enzima.

Outras enzimas utilizam mecanismos similares para diminuir a energia de ativação e acelerar as reações que catalisam. Em reações envolvendo dois ou mais substratos, o sítio ativo também atua como um molde mantendo os reagentes próximos e na orientação correta para que ocorra a reação (**Figura 4-32A**). Como vimos no exemplo da lisozima, o sítio ativo de uma enzima contém grupos

(A) A enzima liga duas moléculas de substrato e as orienta de forma a garantir que a reação entre elas ocorra.

(B) A ligação do substrato à enzima provoca um reordenamento de seus elétrons, criando cargas parciais negativas e positivas que favorecem a reação.

(C) A enzima distorce a molécula de substrato ligada, forçando-a ao estado de transição que favorece a reação.

Figura 4-32 Enzimas podem promover a catálise de reações de diversas formas. (A) Mantendo moléculas de substrato unidas de forma correta. (B) Promovendo a estabilização das cargas dos intermediários da reação. (C) Alterando ângulos de ligação no substrato, acelerando a taxa de uma reação em particular.

químicos precisamente posicionados para acelerar reações por meio da alteração da distribuição eletrônica do seu substrato (Figura 4-32B). A ligação do substrato à enzima causa modificações no seu formato, direcionando-o ao seu estado de transição específico (Figura 4-32C). Por fim, como a lisozima, muitas enzimas participam intimamente da reação pela formação transiente de ligações covalentes entre a cadeia lateral de resíduos do sítio ativo e o substrato. A restauração do estado original da cadeia lateral ocorre em passos subsequentes da reação; assim, a enzima permanece inalterada ao término do processo e pode catalisar muitas outras reações.

A maioria dos fármacos inibe enzimas

Muitos dos fármacos que utilizamos para tratar ou prevenir doenças atuam bloqueando a atividade de enzimas específicas. As estatinas de controle do colesterol inibem a enzima HMG-CoA-redutase, uma enzima envolvida na síntese de colesterol no fígado. O metotrexato mata a maior parte das células tumorosas por meio da inibição da enzima di-hidrofolato-redutase, enzima que sintetiza compostos necessários para a síntese de DNA. Como as células cancerosas perdem importantes sistemas intracelulares de controle, algumas delas são particularmente sensíveis a tratamentos que interrompem a replicação dos cromossomos, o que as torna suscetíveis ao metotrexato.

As companhias farmacêuticas desenvolvem, com frequência, medicamentos utilizando inicialmente métodos automáticos de seleção de compostos a partir de grandes bancos de dados de compostos químicos, em busca de compostos que sejam capazes de inibir a atividade de uma enzima de interesse. Os compostos químicos mais promissores selecionados podem então ser modificados para se tornarem ainda mais efetivos, aumentando a sua afinidade de ligação e especificidade pela enzima-alvo. Como veremos no Capítulo 20, a medicação para o tratamento de câncer Gleevec foi desenhada para inibir especificamente uma enzima cujo comportamento aberrante é necessário para o crescimento de um tipo de câncer chamado de leucemia mieloide crônica. O fármaco se liga com alta afinidade ao sítio de ligação do substrato da enzima, bloqueando a sua atividade (ver Figura 20-53).

Pequenas moléculas firmemente ligadas adicionam funções extras às proteínas

A ordem de aminoácidos confere às proteínas a sua forma e versatilidade para exercer as suas funções, mas em alguns casos apenas os aminoácidos não são o suficiente. Do mesmo modo que utilizamos ferramentas para aumentar e melhorar as habilidades de nossas mãos, proteínas frequentemente utilizam pequenas moléculas não proteicas para desempenhar funções que de outra maneira seriam muito difíceis ou mesmo impossíveis apenas com aminoácidos. A proteína fotorreceptora *rodopsina,* o pigmento púrpura sensível à luz produzido pelos bastonetes da retina, detecta luz através de uma pequena molécula, *retinal,* ligada à proteína por meio de uma ligação covalente com uma cadeia lateral de um resíduo de lisina (**Figura 4-33A**). A molécula de retinal muda sua forma quando

(A) (B)

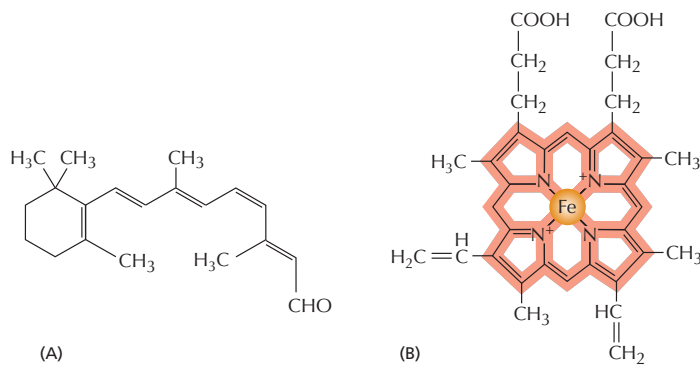



Figura 4-33 Retinal e heme aprimoram a função de certas proteínas. (A) A estrutura do retinal, a molécula sensível à luz ligada à rodopsina em nossos olhos. (B) Estrutura do grupo heme, mostrada com seus carbonos ligados ao heme coloridos em *vermelho* e os átomos de ferro no centro colorido em *laranja*. O grupo heme é firmemente ligado a cada uma das quatro cadeias polipeptídicas da hemoglobina, proteína carreadora de oxigênio, cuja estrutura é mostrada na Figura 4-20.

absorve um fóton de luz, e essa mudança é amplificada pela proteína, disparando uma cascata de reações enzimáticas que podem originar um sinal elétrico a ser transmitido para o cérebro.

Outro exemplo de uma proteína que contém uma porção não proteica é a *hemoglobina* (ver Figura 4-20). Uma molécula de hemoglobina carrega quatro grupos *heme,* moléculas em forma de anel, cada qual com um único átomo central de ferro, ligados por meio de ligações não covalentes (Figura 4-33B). O grupo heme confere à hemoglobina (e ao sangue) a sua cor vermelha. Ligando-se reversivelmente ao gás oxigênio dissolvido, através de seu átomo de ferro, o heme permite que a hemoglobina capte o oxigênio nos pulmões e libere-o nos tecidos.

Quando essas pequenas moléculas estão covalente e permanentemente ligadas à proteína, elas se tornam parte integral da molécula proteica. Veremos no Capítulo 11 que proteínas estão frequentemente ancoradas à membrana celular por moléculas lipídicas covalentemente ligadas. As proteínas de membrana expostas à superfície celular, assim como as que são excretadas da célula, podem ser modificadas pela adição covalente de açúcares e oligossacarídeos.

As enzimas, também, utilizam moléculas não proteicas: elas frequentemente utilizam pequenas moléculas ou átomos de metal firmemente associados ao seu sítio ativo que as auxiliam na sua função catalítica. A *carboxipeptidase,* uma enzima que cliva cadeias polipeptídicas, possui um íon de zinco em seu sítio ativo. Durante a quebra da ligação peptídica, o íon de zinco forma uma ligação transiente com um dos átomos do substrato, colaborando na reação de hidrólise. Em outras enzimas, pequenas moléculas orgânicas servem a propósitos similares. A *biotina,* por exemplo, é encontrada em enzimas que transferem um grupo carboxila ($-COO^-$) de uma molécula à outra (ver Figura 3-37). A biotina participa nesse processo formando uma ligação covalente transiente com o grupo $-COO^-$ a ser transferido, originando assim uma molécula carreadora ativada (ver Tabela 3-2, p. 109). Essa pequena molécula desempenha essa função de maneira mais eficiente do que qualquer aminoácido encontrado nas proteínas. Como a biotina não pode ser sintetizada por humanos, ela deve ser obtida na dieta, sendo classificada como *vitamina.* Outras vitaminas também são necessárias para compor pequenas moléculas que são componentes essenciais de nossas proteínas; a vitamina A, por exemplo, deve ser obtida na dieta para formar retinal, o componente sensível à luz da rodopsina.

COMO AS PROTEÍNAS SÃO CONTROLADAS

Até aqui, examinamos como as proteínas exercem seus papéis: como a ligação a outras proteínas ou pequenas moléculas as permite desempenhar suas funções específicas. Contudo, no interior das células, muitas enzimas e proteínas não trabalham de forma contínua, ou ainda com toda a sua capacidade. A atividade de proteínas e enzimas é controlada, e, dessa forma, a célula pode manter-se

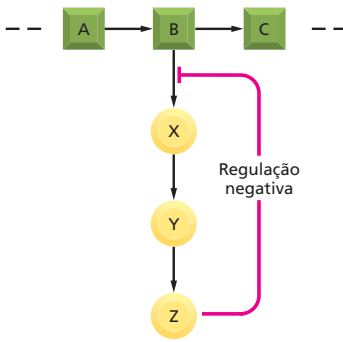



Figura 4-34 **A retroalimentação negativa regula o fluxo de vias biossintéticas.** B é o primeiro metabólito em uma via que origina o produto final Z. Z inibe a primeira enzima que é única a essa via metabólica e necessária para a sua síntese, controlando, assim, a sua própria concentração na célula. Esse é um exemplo de controle negativo.

em condições ótimas, gerando apenas as moléculas que são necessárias em uma dada condição. Controlando quando – e a que velocidade – as proteínas funcionam, a célula evita a depleção das suas reservas energéticas por meio do acúmulo de moléculas que não são necessárias ou do gasto de substratos essenciais. Consideraremos agora como as células controlam a atividade de enzimas e proteínas.

A regulação da atividade proteica ocorre em diferentes níveis. Uma célula pode controlar quantas moléculas de cada enzima são sintetizadas por meio do controle da expressão dos genes que codificam uma proteína específica (discutido no Capítulo 8). A célula pode também controlar a atividade de uma enzima confinando conjuntos de enzimas em compartimentos subcelulares específicos, frequentemente – mas não sempre – delimitados por membranas (discutido nos Capítulos 14 e 15). No entanto, o modo mais rápido e principalmente utilizado para controlar a atividade de uma enzima atua sobre a própria enzima. Apesar de as enzimas poderem ser ativadas – ou inibidas – por uma série de mecanismos, como veremos a seguir, todos esses mecanismos alteram, de alguma maneira, a estrutura da enzima e, consequentemente, a sua função.

As atividades catalíticas de enzimas são frequentemente reguladas por outras moléculas

Uma célula viva contém milhares de enzimas, muitas delas operando ao mesmo tempo e no mesmo volume limitado do citosol. Pela sua ação catalítica, enzimas geram uma rede intrincada de vias metabólicas, cada uma composta por reações químicas em cadeia, em que o produto de uma enzima se torna o substrato da próxima. Nesse labirinto de vias metabólicas, há vários pontos de ramificação nos quais diferentes enzimas competem pelo mesmo substrato. Esse sistema é tão complexo que formas elaboradas de controle são necessárias para regular quando e a que velocidade cada reação deve ocorrer.

O tipo mais comum de controle ocorre quando uma molécula diferente do substrato se liga à enzima em um sítio regulatório distinto do sítio de ligação, alterando a velocidade em que a enzima converte seu substrato em produto. Na **retroalimentação negativa** (de ***feedback inhibition***), a enzima que atua nas etapas iniciais da via metabólica é inibida por um produto posterior dessa mesma via. Assim, quando grandes quantidades do produto final se acumulam, o produto se liga à primeira enzima, diminuindo sua atividade catalítica, limitando a entrada de mais substrato na via metabólica (Figura 4-34). Em pontos onde uma via se ramifica ou intercepta outra, costuma haver múltiplos fatores de controle por diferentes produtos finais, cada um regulando sua própria síntese (Figura 4-35). A retroalimentação negativa tem efeito quase imediato, sendo rapidamente revertido quando as concentrações do produto diminuem.

Esse tipo de retroalimentação é uma *regulação negativa,* ela impede a ação da enzima. As enzimas também podem sofrer *regulação positiva,* na qual a atividade enzimática é estimulada por uma molécula regulatória, e não diminuída. A regulação positiva ocorre quando o produto de uma das ramificações de uma via metabólica estimula a atividade da enzima em outra via. Por exemplo, o acúmulo de ADP ativa as enzimas envolvidas na oxidação de açúcares, estimulando a célula a converter mais ADP em ATP.

QUESTÃO 4-7

Considere o fluxograma da Figura 4-34. O que acontecerá se, em vez do controle negativo indicado:

A. O controle negativo de Z afetar apenas o passo B → C?
B. O controle negativo de Z afetar apenas o passo Y → Z?
C. Z for um controlador positivo do passo B → X?
D. Z for um controlador positivo do passo B → C?

Para cada caso, discuta a utilidade desses controles para a célula.

As enzimas alostéricas possuem dois sítios de ligação que se influenciam mutuamente

Uma característica da retroalimentação negativa inicialmente confundiu seus descobridores: a molécula regulatória em alguns casos possui um formato completamente diferente daquele que a enzima reconhece como seu substrato. Dessa forma, quando esse tipo de regulação foi descoberto, na década de 1960, ele foi chamado de *alosteria* (do grego *allo,* "outro", e *stere,* "sólido" ou

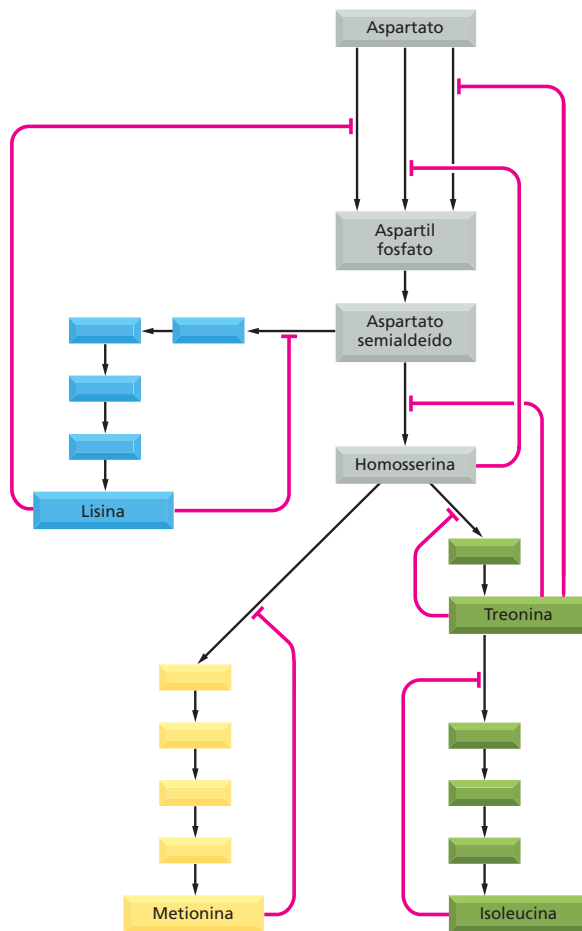
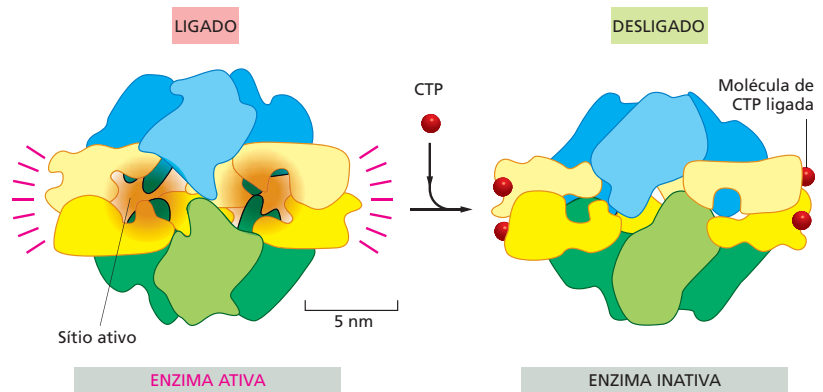



Figura 4-35 A retroalimentação negativa em diferentes pontos regula reações metabólicas relacionadas. Via de biossíntese de quatro diferentes aminoácidos em bactérias, a partir do aminoácido aspartato. As linhas *vermelhas* indicam os locais onde há inibição de uma enzima por um produto posterior da via. Nesse exemplo, cada aminoácido controla a primeira enzima da via responsável pela sua própria síntese, determinando, assim, a sua própria concentração e evitando a síntese desnecessária de intermediários. Os produtos podem, também, inibir separadamente o conjunto de reações responsável por todas as sínteses, pois três enzimas diferentes catalisam a reação inicial de conversão de aspartato em aspartil fosfato, e cada uma dessas enzimas é inibida por um produto diferente.

"forma"). Conforme foram descobertos mais detalhes sobre a retroalimentação negativa, pesquisadores perceberam que muitas enzimas possuem pelo menos dois sítios de ligação em sua superfície: o sítio ativo que reconhece o substrato e um ou mais sítios que reconhecem moléculas regulatórias. Esses dois sítios de ligação se "comunicam" de forma a permitir que eventos catalíticos no sítio ativo sejam influenciados pela ligação da molécula regulatória no seu sítio de ligação independente.

A interação entre sítios localizados em diferentes pontos da superfície da enzima é agora sabidamente dependente de *mudanças conformacionais* da proteína: a ligação em um dos sítios causa uma mudança na estrutura da proteína para uma forma ligeiramente diferente. Muitas enzimas possuem duas conformações que diferem quanto à sua atividade, cada uma estabilizada por ligantes distintos. Durante a retroalimentação negativa, por exemplo, a ligação de um inibidor em um dos sítios promove a mudança da proteína para uma conformação em que seu sítio ativo – localizado em outro local da proteína – se torna menos favorável à ligação do seu substrato (Figura 4-36).

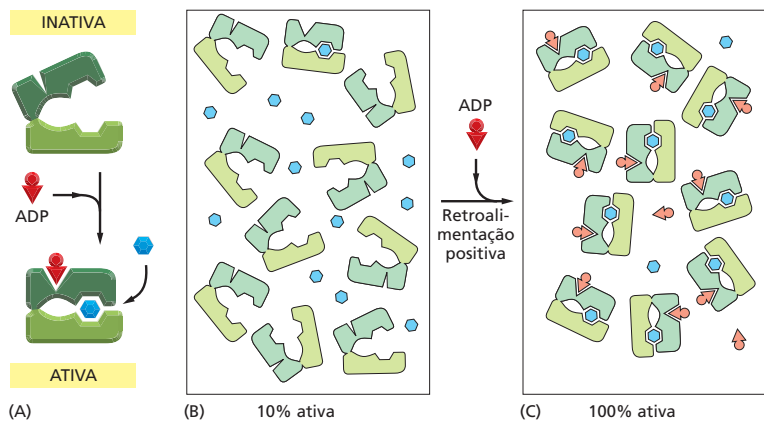
Muitas, se não a maioria, proteínas são **alostéricas**: elas podem adotar duas ou mais conformações ligeiramente distintas, e, pela variação entre elas, sua atividade é modulada. Isso ocorre não apenas para enzimas, mas também para muitas outras proteínas – incluindo proteínas receptoras, estruturais e motoras. A química aqui envolvida se baseia em um conceito muito simples: como cada conformação da proteína possui uma superfície um pouco diferente, os sítios de ligação para cada um dos ligantes será afetado pelas mudanças conformacionais da enzima. Cada ligante estabiliza a conformação a que se liga mais fortemente, e, em concentrações altas o suficiente, os ligantes ten-

Figura 4-36 A retroalimentação negativa dispara uma mudança conformacional. Uma enzima utilizada nos primeiros estudos sobre regulação alostérica foi a aspartato-transcarbamoilase de *E. coli*. Essa enzima composta de várias subunidades (ver Figura 4-9) catalisa uma importante reação que inicia a síntese do anel pirimídico dos nucleotídeos C, U e T. Um dos produtos finais dessa via, a trifosfato de citosina (CTP), liga-se à enzima inibindo-a quando há concentrações elevadas de CTP. Esse diagrama mostra a mudança conformacional que ocorre quando a enzima é inibida pela ligação da CTP. Note que a aspartato-transcarbamoilase na Figura 4-9 é mostrada vista de cima. Nesta figura, a enzima é mostrada na sua visão lateral.

derão a mudar a população de proteínas para a conformação que os favorece (**Figura 4-37**).

A fosforilação pode controlar a atividade enzimática pela indução de mudanças conformacionais

As enzimas não são controladas apenas pela ligação de pequenas moléculas. Outro método comumente utilizado por células eucarióticas para regular a atividade de proteínas envolve a ligação covalente de grupos fosfato à cadeia lateral de um de seus aminoácidos. Como cada grupo fosfato possui duas cargas negativas, a adição enzimaticamente catalisada de um grupo fosfato a uma proteína pode causar mudanças conformacionais, como, por exemplo, a atração de conjuntos de aminoácidos carregados positivamente. Essa mudança conformacional pode afetar a ligação do substrato à superfície da proteína, alterando sua atividade. A remoção do grupo fosfato por uma segunda enzima retorna a proteína à sua conformação original, restaurando sua atividade inicial.

A **fosforilação proteica** reversível controla a atividade de muitos tipos proteicos na célula eucariótica; esse método é de uso tão disseminado que mais de um terço das aproximadamente 10.000 proteínas de uma célula característica de mamífero parecem sofrer fosforilação em algum momento. A adição e a remoção de grupos fosfato de uma proteína geralmente ocorrem em resposta a mudanças específicas no estado da célula. Por exemplo, a série de eventos desencadeados durante a divisão celular é regulada dessa forma (discutido no Capítulo 18). Muitos sinais gerados por hormônios e neurotransmissores são

Figura 4-37 O equilíbrio entre duas conformações de uma proteína é afetado pelos seus ligantes. Esse diagrama esquemático mostra uma enzima hipotética em que o aumento da concentração de ADP (*cunhas vermelhas*) age como um ativador, acelerando a taxa em que moléculas de açúcar (hexágonos *azuis*) são oxidadas. (A) Essa enzima hipotética é regulada alostericamente. (B) Na ausência de ADP, apenas uma pequena fração das moléculas adota espontaneamente a conformação ativa (fechada); a maioria permanece inativa (aberta). (C) Uma vez que o ADP se liga apenas à proteína na conformação fechada, a adição de moléculas de ADP ao meio diminui a energia da conformação fechada, modificando praticamente todas as moléculas da enzima para sua forma ativa. Essa enzima pode ser utilizada nas vias metabólicas da respiração celular, por exemplo, quando há acúmulo de ADP nas células, acelerando o catabolismo de açúcares para gerar mais energia para a produção de ATP a partir de ADP.

transportados da membrana plasmática ao núcleo por meio de cascatas de fosforilação (discutido no Capítulo 16).

A fosforilação de uma proteína ocorre pela transferência, catalisada por uma enzima, de um grupo fosfato terminal do ATP para um grupo hidroxila da cadeia lateral de uma serina, treonina ou tirosina. Essa reação é catalisada por uma **proteína-cinase**. A reação reversa – a remoção do grupo fosfato ou *desfosforilação* – é catalisada por uma **proteína-fosfatase** (**Figura 4-38A**). A fosforilação pode estimular a atividade de uma proteína, ou inibi-la, dependendo da proteína envolvida nesse processo e do local em que a fosforilação ocorre (Figura 4-38B). As células contêm centenas de proteína-cinases diferentes, cada uma responsável pela fosforilação de uma proteína diferente ou de um conjunto de proteínas. Células também contêm diferentes proteína-fosfatases; algumas são altamente específicas, removendo grupos fosfato apenas de um tipo de proteína, ou de muito poucas proteínas, e outras atuam sobre conjuntos de proteínas. O estado de fosforilação de uma proteína em um dado momento – e consequentemente sua atividade – depende da atividade das proteína-cinases e fosfatases que atuam sobre ela.

Para muitas proteínas, grupos fosfato são adicionados e removidos de cadeia laterais de aminoácidos específicos em ciclos contínuos. Os ciclos de fosforilação desse tipo permitem a modulação rápida da atividade proteica. Quanto mais veloz o ciclo, mais rápido a concentração de proteína fosforilada pode ser alterada em resposta a estímulos repentinos que induzam o aumento da sua taxa de fosforilação. No entanto, a manutenção do ciclo de fosforilação é energeticamente custosa, pois uma molécula de ATP é hidrolisada a cada volta do ciclo.

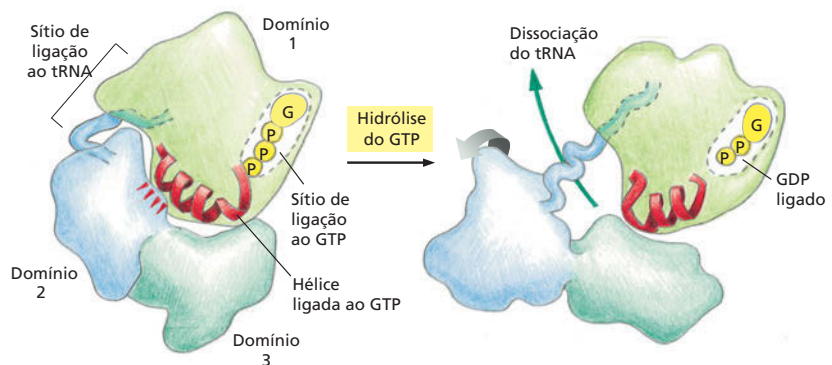
Figura 4-38 A fosforilação é um método comum de regular a atividade de uma proteína. Centenas de proteínas em uma célula eucariótica típica são modificadas pela adição covalente de grupos fosfato. (A) A reação geral, mostrada aqui, envolve a transferência de um grupo fosfato do ATP para a cadeia lateral de um aminoácido da proteína-alvo da proteína-cinase. A remoção do grupo fosfato é catalisada por uma segunda enzima, proteína-fosfatase. Nesse exemplo, o fosfato é adicionado à cadeia lateral do aminoácido serina; em outros casos, o grupo fosfato é adicionado ao grupo –OH de uma treonina ou tirosina. (B) A fosforilação catalisada por uma proteína-cinase pode aumentar ou diminuir a atividade proteica, dependendo do local da fosforilação e da estrutura da proteína.

As proteínas ligadoras de GTP também são reguladas pelo ciclo de adição e remoção de grupos fosfato

As células eucarióticas possuem ainda um segundo meio de regular atividade proteica pela adição e remoção de grupos fosfato. Nesse caso, em vez da transferência enzimática de ATP para a proteína, o fosfato é parte do nucleotídeo guanina – trifosfato de guanosina (GTP) ou guanosina difosfato (GDP) – que é ligado à proteína. Essas **proteínas ligadoras de GTP** estão em sua forma ativa quando ligadas à GTP; a própria proteína hidrolisa esse GTP à GDP – liberando um fosfato – e muda para a sua conformação inativa. Como na fosforilação mediada por proteínas, esse processo é reversível. A forma ativa é restaurada pela dissociação da GDP e pela ligação a uma nova molécula de GTP (**Figura 4-39**).

Um grande número de proteínas ligadoras de GTP funciona como "interruptor" molecular nas células. A dissociação de GDP e a sua troca por uma nova GTP ativa a proteína, geralmente em resposta a um sinal recebido pela célula. Essas proteínas geralmente se ligam a outras, controlando a atividade enzimática, e são essenciais nas vias de sinalização intracelular, o que será discutido em mais detalhes no Capítulo 16. Aqui, examinaremos o mecanismo geral desse processo com o exemplo do fator bacteriano de elongação EF-Tu, uma pequena proteína ligadora de GTP que atua no transporte de moléculas de tRNA para o ribossomo durante a síntese proteica (discutido no Capítulo 17).

Figura 4-39 Proteínas ligadoras de GTP são "interruptores" moleculares. A atividade das proteínas ligadoras de GTP (*verde*) geralmente requer a presença de uma molécula de GTP ligada à sua estrutura (forma ativa). A hidrólise dessa molécula de GTP produz GDP e fosfato inorgânico (Pi) e causa a mudança dessa proteína para uma conformação distinta, e geralmente inativa. Como mostrado aqui, para voltar à sua forma ativa, a proteína deve dissociar-se da molécula de GDP, um processo lento que pode ser acelerado por estímulos específicos; uma vez dissociado a GDP, uma molécula de GTP é rapidamente religada.

Figura 4-40 Uma grande mudança conformacional é produzida na proteína EF-Tu em resposta à hidrólise do nucleotídeo. (A) A proteína ligadora de GTP Ef-Tu liga os tRNAs no ribossomo e desempenha um papel na elongação da cadeia polipeptídica durante a síntese proteica. Na sua forma ligada ao GTP, EF-Tu se encontra fortemente ligada à molécula de tRNA. A hidrólise da molécula de GTP ligada ao EF-Tu causa uma mudança na posição dos aminoácidos no sítio de ligação do nucleotídeo (equivalente a pouco mais do que o diâmetro de um átomo de hidrogênio). Essa pequena mudança é amplificada por mudanças conformacionais na proteína, produzindo um grande movimento. A hidrólise de GTP cliva uma ligação intramolecular, que funciona como um grampo (traços *vermelhos* na estrutura da esquerda), o que permite que os domínios 2 e 3 se movam livremente, girando aproximadamente 90°. Isso cria uma grande mudança na forma e dissocia a molécula de tRNA, processo necessário para que a síntese proteica continue no ribossomo (**Animação 4.10**). Todas essas estruturas foram determinadas por cristalografia por raios X.

A análise da estrutura tridimensional da EF-Tu revelou como a transição alostérica, disparada pela adição e remoção de fosfato no nucleotídeo de guanina, causa mudanças na conformação da proteína. A **Figura 4-40** mostra como a perda de um único grupo fosfato, que inicialmente causa um pequeno movimento de apenas 0,1 nm no sítio de ligação, é amplificada pela proteína, gerando um movimento 50 vezes maior. Esse tipo de mudança drástica na forma é também responsável pelos movimentos criados pelo tipo de proteína considerado a seguir.

A hidrólise de nucleotídeos permite que proteínas motoras realizem grandes movimentos nas células

Vimos até aqui que mudanças conformacionais em proteínas são importantes na regulação enzimática e na sinalização celular. Alterações conformacionais também desempenham outro papel importante na operação da célula: elas permitem que as proteínas cuja maior função seja mover outras moléculas, as **proteínas motoras**, gerem a força responsável pela contração muscular e pelo movimento celular. As proteínas motoras são também responsáveis pelos movimentos em pequena escala no interior da célula: elas ajudam a mover cromossomos para lados opostos da célula durante a mitose (discutida no Capítulo 18), a deslocar organelas no citosol (discutido no Capítulo 17) e a mover enzimas ao longo da cadeia de DNA durante a sua replicação (discutido no Capítulo 6). Entender como proteínas podem operar como moléculas com partes motoras é essencial para compreender as bases moleculares do comportamento celular.

Como mudanças na forma de uma proteína podem ser empregadas para gerar movimentos ordenados nas células? Se, por exemplo, uma proteína precisa deslocar-se ao longo de uma linha, como uma molécula de DNA, ela pode fazer isso com uma série de mudanças conformacionais – como ilustrado na **Figura 4-41**. Entretanto, sem mecanismos de controle que tornem essas mudanças uma sequência ordenada, em uma única direção, o movimento é perfeitamente reversível, e a proteína pode deslocar-se aleatoriamente para frente e para trás.

Figura 4-41 Mudanças na sua conformação permitem que proteínas se desloquem ao longo de um filamento ou de uma linha. As três conformações dessa proteína permitem que ela se desloque aleatoriamente para frente e para trás quando ligada a um filamento ou a uma linha. Sem um aporte de energia que direcione esse movimento, a proteína permanecerá se deslocando sem direção, sem chegar a lugar algum.

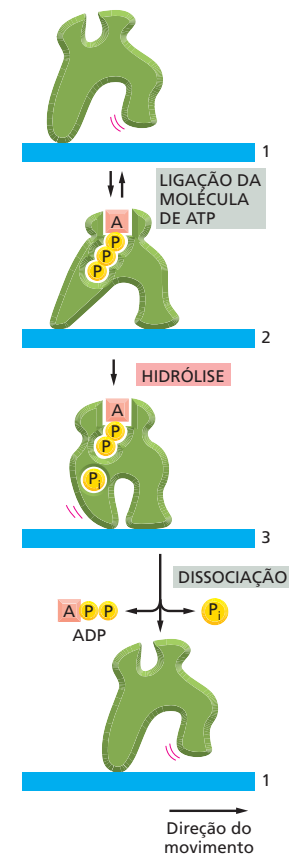
Para tornar uma série de mudanças conformacionais em um movimento unidirecional e forçar todo o ciclo em uma única direção, é suficiente que um dos seus passos seja irreversível. Para a maioria das proteínas capazes de se deslocar em uma única direção por longas distâncias, a irreversibilidade do ciclo é obtida pela associação de uma das mudanças conformacionais à hidrólise de uma molécula de ATP ligada à proteína – conforme ilustrado no modelo esquemático da **Figura 4-42**. Esse mecanismo é similar ao que ocorre nas mudanças na forma desencadeada alostericamente pela hidrólise de GTP. Como uma grande quantidade de energia é liberada quando a molécula de ATP (ou GTP) é hidrolisada, é muito pouco provável que a proteína ligadora de nucleotídeo reverta a mudança na sua conformação – o que seria necessário para que ela se deslocasse

Figura 4-42 Uma proteína motora alostérica tem movimento direcionado pela hidrólise de ATP. A transição ordenada entre as três conformações é garantida pela hidrólise da molécula de ATP ligada à proteína. Como uma das transições – a mudança da conformação 2 para a conformação 3 – é associada à hidrólise de ATP, todo o ciclo se torna irreversível. Ciclos repetidos movem a proteína continuamente para a direita.

para trás –, pois também seria necessário reverter a hidrólise de ATP adicionando um grupo fosfato à molécula de ADP, formando ATP.

Muitas proteínas motoras geram movimentos direcionados dessa maneira, incluindo a proteína responsável pelo movimento muscular *miosina* – que "corre" ao longo dos filamentos de actina, gerando a contração dos músculos (discutido no Capítulo 17) – e a *cinesina,* proteína envolvida no movimento dos cromossomos na mitose (discutido no Capítulo 18). Esses movimentos podem ser rápidos: algumas das proteínas motoras envolvidas na replicação do DNA se deslocam ao longo da molécula de DNA na velocidade de até 1.000 nucleotídeos por segundo.

Proteínas frequentemente formam grandes complexos que funcionam como máquinas proteicas

Com a evolução a partir de uma pequena proteína, formada por um só domínio, até grandes moléculas proteicas formadas por muitos domínios, a função que uma proteína pode desempenhar também se torna mais elaborada. As tarefas mais impressionantes são desempenhadas por agregados de proteínas formados por muitas moléculas. Com a possibilidade de reconstruir processos biológicos em meios extracelulares em laboratórios, ficou claro como cada um dos processos centrais de uma célula – replicação de DNA, síntese proteica, formação de vesículas e sinalização celular – é catalisado por conjuntos coordenados de 10 ou mais proteínas ligadas. Na maioria dessas **máquinas proteicas**, é a hidrólise de um trifosfato de nucleosídeo ligado (ATP de GTP) que direciona e ordena séries de mudanças na conformação em algumas das subunidades individualmente, permitindo que todo o conjunto se mova de forma coordenada. Assim, enzimas apropriadas podem ser deslocadas diretamente para os locais onde são necessárias para executar reações em uma série, como na síntese de proteínas nos ribossomos (discutido no Capítulo 7) ou na replicação do DNA – onde um grande complexo multienzimático se move rapidamente ao longo do DNA. Uma simples analogia mecânica é ilustrada na Figura 4-43.

QUESTÃO 4-8

Explique como a fosforilação e a ligação de um nucleotídeo podem regular a atividade de uma proteína. Quais seriam as vantagens dessas formas de regulação?

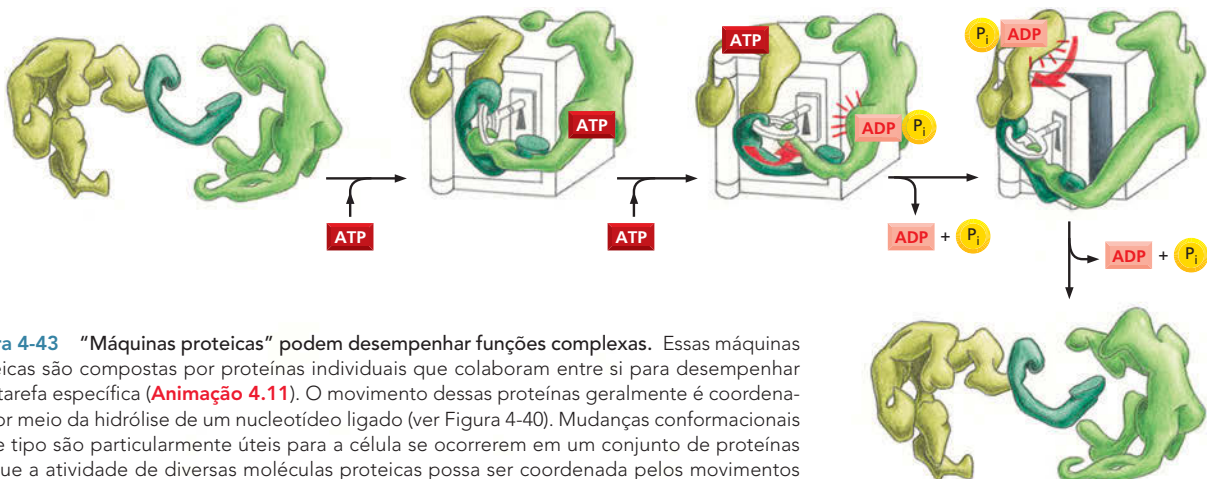



Figura 4-43 "Máquinas proteicas" podem desempenhar funções complexas. Essas máquinas proteicas são compostas por proteínas individuais que colaboram entre si para desempenhar uma tarefa específica (**Animação 4.11**). O movimento dessas proteínas geralmente é coordenado por meio da hidrólise de um nucleotídeo ligado (ver Figura 4-40). Mudanças conformacionais desse tipo são particularmente úteis para a célula se ocorrerem em um conjunto de proteínas em que a atividade de diversas moléculas proteicas possa ser coordenada pelos movimentos do complexo.

QUESTÃO 4-9

Explique por que é mais vantajoso para as enzimas da Figura 4-43 trabalharem associadas em um complexo do que tentar abrir o cofre separadamente, atuando de maneira sequencial.

Por meio da evolução, as células foram aptas a construir máquinas proteicas capazes de realizar a maioria das reações biológicas. As células utilizam essas máquinas proteicas pelos mesmos motivos que nós humanos criamos máquinas elétricas e mecânicas: para qualquer trabalho, o emprego de processos coordenados espacial e temporalmente é muito mais eficiente do que o uso sequencial de ferramentas individuais.

Modificações covalentes controlam a localização e a formação de agregados proteicos

Máquinas proteicas e outros complexos de proteínas desempenham importantes papéis na vida da célula. Entretanto, esses complexos não estão presentes em locais aleatórios do interior da célula, já formados e prontos para executarem suas funções. Recentemente se tornou claro que muitas máquinas proteicas são formadas em locais específicos da célula e são ativadas apenas quando necessário. Essa mobilização geralmente é obtida por meio de adições covalentes de grupos modificadores a uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos específicos das proteínas que compõem os complexos.

Mais de 200 tipos de modificações covalentes podem ocorrer na célula, cada uma ajudando a regular uma função proteica. Até então nos concentramos na adição e na remoção de grupos fosfato. Como vimos, a fosforilação pode aumentar ou diminuir a atividade de uma proteína (ver Figura 4-38). Ela também pode promover a formação de grandes agregados proteicos. Por exemplo, sinais extracelulares podem induzir a fosforilação de uma classe de proteínas transmembrana chamadas de *receptores tirosina-cinase*; essa fosforilação frequentemente desencadeia a formação e a ativação de complexos intracelulares elaborados de sinalização celular, que transmitem a mensagem de crescer ou se dividir (ver Figura 16-30). Outras modificações covalentes possuem diferentes papéis reguladores. A adição do acido graxo palmitato a um resíduo de cisteína promove a associação da proteína à membrana plasmática. A adição da ubiquitina, um polipeptídeo de 76 aminoácidos, pode marcar uma proteína para a degradação, como foi visto no Capítulo 7. Cada um desses grupos é adicionado ou removido enzimaticamente, dependendo das necessidades da célula.

Um grande número de proteínas é conhecido atualmente por serem modificadas em uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos. A proteína p53, que desempenha papel central no controle das respostas celulares a danos no DNA,

Figura 4-44 A modificação de uma proteína, em diferentes locais, gera um código de regulação que controla o comportamento da proteína. (A) Uma combinação particular de modificações é determinada por diferentes sinais oriundos do interior ou do exterior da célula (ver Capítulo 16) e é utilizada pela célula para direcionar a atividade ou a localização de uma proteína. Por exemplo, a fosforilação (símbolo *amarelo*) geralmente afeta a localização e a atividade de uma proteína, e a presença de ubiquitina (símbolo *verde*) geralmente direciona uma proteína para a degradação (ver Capítulo 7). (B) São mostradas algumas das modificações covalentes que controlam a atividade e a degradação da proteína p53, uma importante proteína de regulação da expressão gênica que regula a resposta celular a danos (ver Capítulo 18). Note que nem todas estas modificações – fosforilação, ubiquitinização e acetilação (símbolos *azuis*) – estarão presentes ao mesmo tempo. As cores ao longo da proteína representam os domínios proteicos distintos.

pode ser modificada em 20 locais distintos (**Figura 4-44A**). Como um grande número de combinações dessas 20 modificações é possível, o comportamento da proteína pode, em princípio, ser alterado de diversas formas.

O conjunto de modificações covalentes que uma proteína apresenta em um dado momento constitui um importante **código** combinatório **de regulação proteica**. A ligação ou a remoção desses grupos modificadores controla o comportamento da proteína, alterando a sua atividade ou estabilidade, seus ligantes ou a sua localização no interior da célula (ver Figura 4-44). Esse código de regulação permite à célula o uso ótimo das suas proteínas, além de permitir que a célula responda rapidamente a alterações nas suas condições ou nas condições do ambiente.

COMO AS PROTEÍNAS SÃO ESTUDADAS

Compreender como uma proteína funciona requer análises bioquímicas e estruturais detalhadas – e ambas requerem grandes quantidades de proteína na forma pura. No entanto, isolar um único tipo de proteína a partir de milhares de outras proteínas presentes na célula não é uma tarefa trivial. Por muitos anos, as proteínas foram purificadas diretamente de suas fontes: os tecidos em que eram expressas em maior quantidade. Essa técnica era bastante inconveniente, exigindo, por exemplo, viagens diárias a abatedouros. Ainda de maior importância, a complexidade dos tecidos intactos e dos órgãos é uma grande desvantagem no processo de purificação de moléculas específicas, pois uma longa série de etapas cromatográficas se faz necessária. Esses procedimentos não apenas requerem semanas para a sua realização, como também apresentam rendimento de poucos miligramas de proteína purificada.

Hoje, as proteínas são frequentemente isoladas de células cultivadas em laboratório. Essas células costumam ser alteradas para a produção de grandes quantidades de uma dada proteína, utilizando técnicas de engenharia genética que serão descritas no Capítulo 10. Tais células permitem que grandes quantidades de proteína pura sejam obtidas em apenas alguns dias.

Nesta seção – e nos Painéis 4-4 a 4-6 (p. 164-167) –, descreveremos como as células podem ser cultivadas em cultura e como as proteínas são purificadas a partir dessas e de outras células. Na seção **Como Sabemos** (p. 158-160), descreveremos como essas proteínas são analisadas para a determinação da sua sequência de aminoácidos e da sua estrutura tridimensional. Por fim, discutiremos como os esforços para a determinação de estruturas e funções de proteínas estão sendo conduzidos em larga escala, com a intenção de se obter uma maior compreensão sobre como conjuntos de proteínas atuam para tornar a vida possível.

Células podem ser cultivadas em placas de cultura

Uma vez fornecidas as condições ideais, a maior parte das células de plantas e animais irá sobreviver, proliferar e também expressar propriedades especializadas em uma placa de cultura. Experimentos realizados utilizando células em cultura são chamados de experimentos realizados *in vitro* (literalmente, "no vidro"), em contraste aos experimentos realizados nos organismos intactos, que são chamados de experimentos *in vivo* (literalmente, "em organismos vivos"). Esses termos podem originar alguma confusão, pois são utilizados com sentidos bastante distintos na química. Em laboratórios de bioquímica, *in vitro* se refere a reações realizadas em um tubo de ensaio, na ausência de células, ao passo que *in vivo* se refere a qualquer reação que ocorra em uma célula viva, mesmo as células em cultura.

Embora não seja verdade para todos os tipos de células, a maior parte das células cultivadas em cultura mostra as propriedades diferenciadas apropriadas à sua origem: fibroblastos, as células precursoras do tecido conectivo, continuam a secretar colágeno; as células derivadas da musculatura esquelética embrionária se fundem em fibras musculares que se contraem espontaneamente na placa de cultura; células nervosas estendem axônios que são eletricamente excitáveis e

COMO SABEMOS:
RESOLVENDO A ESTRUTURA DE PROTEÍNAS

Como você certamente já concluiu, a partir da leitura deste capítulo, a estrutura determina a função. Para as proteínas, a estrutura tridimensional da molécula determina a função que ela exerce. Para aprendermos mais sobre como uma proteína funciona, é de grande auxílio sabermos como ela é.

A questão é que muitas proteínas são muito pequenas para serem vistas em detalhes, mesmo com potentes microscópios eletrônicos. Para seguir a direção de uma cadeia de aminoácidos dentro de uma grande molécula proteica, é necessário "ver" os átomos que formam cada um dos aminoácidos. Os cientistas utilizam principalmente dois métodos para mapear a localização dos átomos que compõem uma proteína. O primeiro envolve o uso de raios X. Assim como a luz, os raios X são radiação eletromagnética. Contudo, o seu comprimento de onda é muito menor: 0,1 nanômetro (nm) em comparação ao comprimento de onda de 400 a 700 nm da luz visível. Esse pequeno comprimento de onda – que é igual ao diâmetro aproximado do átomo de hidrogênio – permite aos cientistas a visão detalhada de estruturas muito pequenas, em nível atômico.

O segundo método, chamado de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), baseia-se no fato de os núcleos de muitos átomos apresentarem um magnetismo intrínseco. Quando expostos a grandes campos magnéticos, esses núcleos agem como pequenas barras magnéticas e são alinhados com o campo magnético. Se forem excitados por ondas de rádio, os núcleos oscilarão ao redor dos seus eixos magnéticos, e, quando decaírem de volta ao seu nível energético original, cada núcleo originará um sinal que pode ser utilizado para revelar as suas posições relativas no interior de uma proteína.

Utilizando essas técnicas, pesquisadores resolveram a estrutura de milhares de proteínas. Com o auxílio de programas de computação gráfica, eles foram capazes de investigar o interior dessas proteínas, explorando os sítios de maior afinidade pela molécula de ATP, ou examinando as voltas e hélices que as proteínas utilizam para se associar a outras proteínas ou para se ligarem a segmentos da cadeia de DNA. Se a proteína em estudo pertencer a um vírus, ou à célula de um tumor, o estudo da sua estrutura pode auxiliar no desenvolvimento de medicamentos que atuem no controle da infecção ou na eliminação do tumor.

No entanto, antes de poder submeter uma proteína a feixes de raios X, ou a grandes campos magnéticos, ela deve ser isolada e purificada em grandes quantidades (ver Painéis 4-4, 4-5 e 4-6, p. 164-167). Também é necessário saber a sua sequência de aminoácidos; assim, as informações coletadas sobre o arranjo espacial dos átomos poderão ser mais facilmente interpretadas. Portanto, iniciaremos a nossa discussão acerca da resolução da estrutura de proteínas com uma breve discussão dos métodos de determinação da sequência de aminoácidos de uma proteína.

Identificação

Antes de uma proteína ser sequenciada (ou seja, antes que a ordem de seus aminoácidos seja determinada), ela é quebrada em pedaços menores por proteases de ação seletiva. A enzima tripsina, por exemplo, cliva cadeias polipeptídicas na porção carboxila dos resíduos de lisina e arginina. Assim, se uma proteína possui nove lisinas e sete argininas, a digestão com tripsina resultará em 17 fragmentos de peptídeo. A identidade dos aminoácidos em cada um dos fragmentos pode ser determinada quimicamente. Em alguns casos, esses fragmentos de peptídeos são parcialmente sequenciados utilizando métodos químicos, e essas sequências parciais são utilizadas para realizar buscas em bancos de dados para identificar a sequência completa da qual são derivadas.

Outro método, mais rápido, para determinar a sequência de aminoácidos – em especial quando um grande número de proteínas está sendo isolado e identificado simultaneamente – é a espectrometria de massas. Essa técnica determina a massa exata de cada um dos fragmentos de peptídeo gerados, e essa informação permitirá a identificação da proteína a partir de uma lista de todas as proteínas produzidas pelo organismo estudado. O processo funciona da seguinte maneira. Os peptídeos derivados da digestão com tripsina são secos em uma placa de metal. A amostra é então submetida a um feixe de *laser*, que aquece os peptídeos, tornando-os eletricamente carregados (ionizados), o que causa a sua ejeção da placa, em forma de gás. Pela aceleração em um forte campo magnético, os peptídeos ionizados são lançados na direção de um detector, e o tempo que cada peptídeo ionizado leva para atingir o detector é relacionado com a sua massa e carga. (Quanto maior o peptídeo, mais lentamente ele se move, e quanto maior a sua carga, maior a sua velocidade.) O conjunto exato de massas dos fragmentos da proteína, gerados pela digestão com tripsina, serve como uma "impressão digital", que permite a identificação da proteína – e seu gene correspondente – a partir de um banco de dados de sequências (**Figura 4-45**).

Raios X

Uma vez que você tenha determinado a sequência de aminoácidos de uma proteína e tenha obtido quantidades suficientes dessa proteína para conduzir experimentos, o verdadeiro desafio inicia. Para determinar a estrutura de uma proteína usando cristalografia por raios X, é preciso formar cristais da proteína: arranjos ordenados e grandes da proteína pura, onde cada molécula possui a mesma conformação e está perfeitamente alinhada com as moléculas vizinhas. A produção desses cristais de alta qualidade é quase uma arte e requer métodos de tentativa e erro para seleção das melhores condições de solventes e etc. Podem ser necessários anos até que as condições ótimas sejam identificadas, e algumas proteínas simplesmente não formam cristais.

Se você tiver sorte na obtenção de cristais, você está pronto para a análise por difração de raios X. Quando um estreito feixe de raios X é apontado para o cristal, os átomos da proteína desviam os raios incidentes. Essas ondas que foram desviadas podem somar-se ou anular-se, pro-

duzindo um complexo padrão de difração que é captado por detectores eletrônicos. A intensidade e a posição de cada ponto captado contêm informações sobre a posição dos átomos no cristal da proteína (Figura 4-46).

Esses padrões de difração são tão complexos – mesmo uma pequena proteína pode gerar 25.000 pontos – que requerem o uso de computadores para serem interpretados e transformados, por meio de complexos cálculos matemáticos, em mapas que indicam a localização espacial relativa de cada átomo. Combinando as informações obtidas nesses mapas e a sequência de aminoácidos da proteína, um modelo atômico da sua estrutura pode ser gerado. Para determinar se a proteína sofre alguma mudança conformacional em presença de um ligante que ative sua função, deve-se tentar cristalizar a mesma proteína em presença desse ligante. Com cristais com qualidade suficiente, pequenos movimentos dos átomos podem ser detectados pela comparação das estruturas obtidas na presença e na ausência de ligantes ativadores ou inibidores.

Figura 4-45 A espectrometria de massas pode ser utilizada para identificar proteínas pela determinação precisa da massa dos peptídeos dela derivados. Conforme indicado, isso permite que proteínas sejam produzidas em grandes quantidades, necessárias para a determinação da sua estrutura tridimensional. Nesse exemplo, a proteína de interesse é removida de um gel bidimensional de poliacrilamida (ver Painel 4-6, p.167) e, então, digerida com tripsina. Os fragmentos peptídicos resultantes são colocados em um espectrômetro de massa onde suas massas exatas são determinadas. Bancos de dados de sequências são então percorridos para encontrar proteínas cujo perfil de digestão por tripsina seja compatível com os valores obtidos experimentalmente. Misturas de proteínas podem ser analisadas dessa maneira. (Imagem: cortesia de Patrick O'Farrell.)

RMN

O problema da cristalografia por raios X é a necessidade da obtenção de cristais. Nem todas as proteínas formam redes cristalinas ordenadas. Algumas podem apresentar porções irregulares na sua estrutura que impedem a sua organização em rede cristalina. Outras proteínas podem não formar cristais na ausência de membranas em que normalmente estariam inseridas.

Há outra maneira de resolver a estrutura de uma proteína, uma que não requer a obtenção de cristais. Se for uma proteína pequena – de 50.000 dáltons ou menos –, você poderá determinar sua estrutura por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Nessa técnica, uma solução contendo a proteína pura concentrada é colocada em um forte campo magnético e então bombardeada com ondas de rádio de diferentes frequências. Os núcleos dos átomos de hidrogênio da proteína irão gerar um sinal de RMN que pode ser utilizado para determinar a distância entre os aminoácidos em diferentes partes da proteína. Essa informação pode ser utilizada para gerar um modelo do arranjo espacial desses átomos. Novamente, combinados à sequência de aminoácidos da proteína, o espectro de RMN permite a predição da estrutura tridimensional da proteína (Figura 4-47). Caso a proteína seja maior do que 50.000 dáltons, pode tentar-se quebrá-la nos seus domínios funcionais e então realizar a análise por RMN de cada um desses domínios.

Como a determinação da conformação precisa de uma proteína requer muito tempo e é bastante dispendiosa – e seus resultados são valiosos –, os cientistas tornam livres as estruturas que determinam submetendo essas informações a bancos de dados de acesso público. Graças a esses bancos de dados, qualquer pessoa interessada na estrutura de, digamos, um ribossomo – um complexo formado por várias cadeias de RNA e por mais de 50 proteínas – pode obtê-la facilmente. No futuro, melhoras nas técnicas de cristalografia por raios X e RMN irão permitir análises mais rápidas de muitas proteínas e de complexos proteicos. Uma vez que estruturas suficientes estejam descritas, poderá ser possível gerar algoritmos que sejam capazes de predizer a estrutura de uma proteína tendo como base apenas sua sequência de aminoácidos. Afinal, é essa sequência de aminoácidos que determina sozinha como a proteína se enovela na sua estrutura tridimensional.

Padrão de difração dos raios X obtido do cristal de proteína

Raios difratados

Feixe de raios X

Aparador

Cristal de proteína

Fonte de raios X

(A)

(B)

(C)

(D)

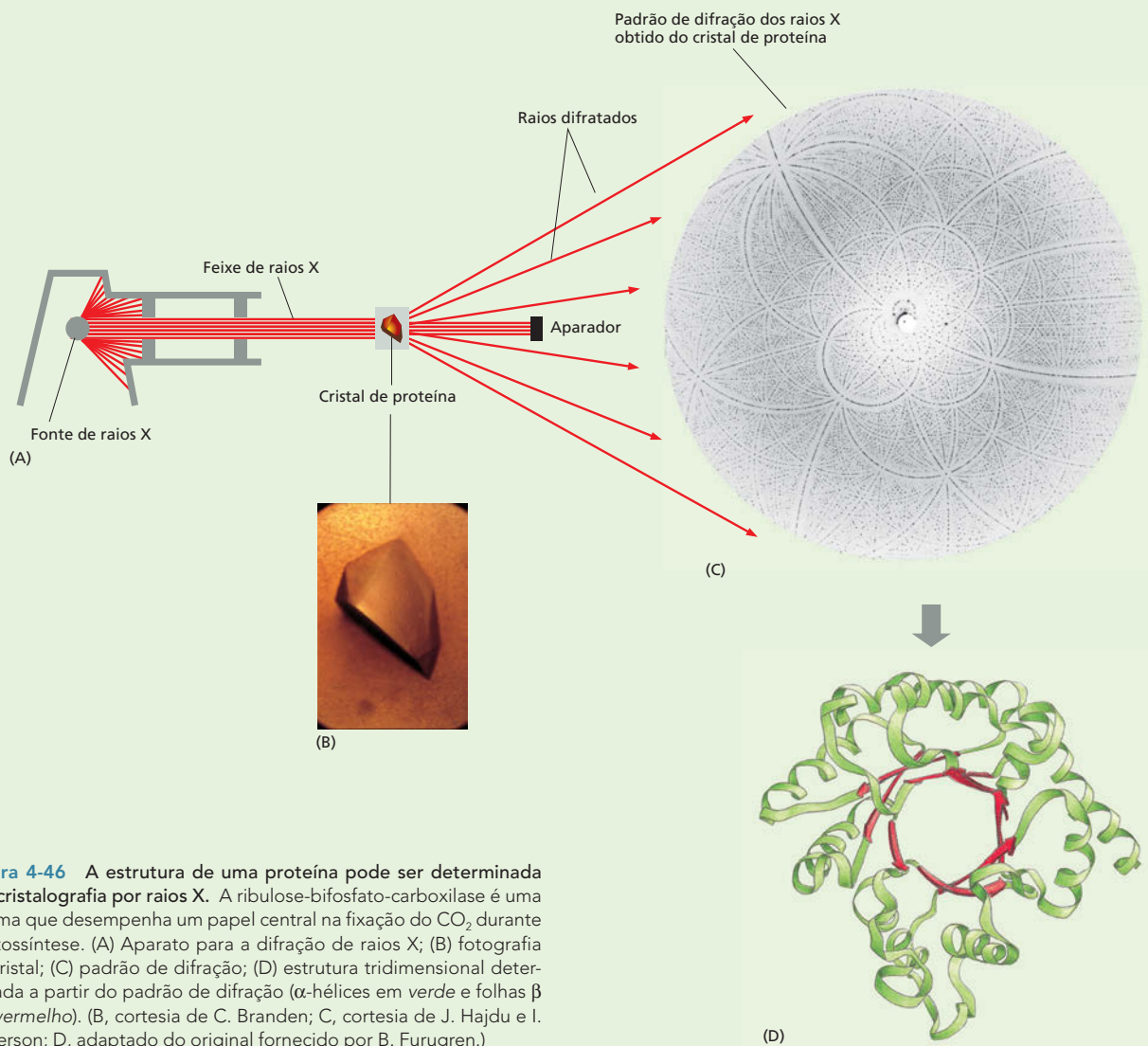



Figura 4-46 A estrutura de uma proteína pode ser determinada por cristalografia por raios X. A ribulose-bifosfato-carboxilase é uma enzima que desempenha um papel central na fixação do CO_2 durante a fotossíntese. (A) Aparato para a difração de raios X; (B) fotografia do cristal; (C) padrão de difração; (D) estrutura tridimensional determinada a partir do padrão de difração (α-hélices em *verde* e folhas β em *vermelho*). (B, cortesia de C. Branden; C, cortesia de J. Hajdu e I. Anderson; D, adaptado do original fornecido por B. Furugren.)

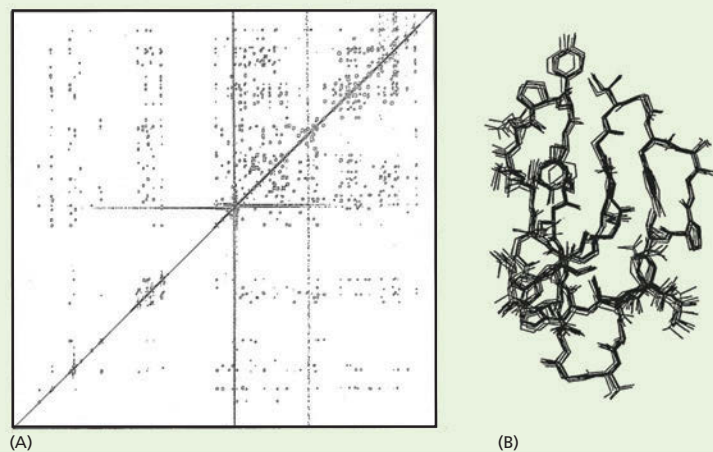



Figura 4-47 A espectroscopia por RMN pode ser utilizada para determinar a estrutura de pequenas proteínas ou de domínios proteicos. (A) Espectro bidimensional de RMN derivado do domínio C-terminal da enzima celulase. Os pontos representam interações entre átomos vizinhos de hidrogênio. (B) O conjunto de estruturas sobrepostas mostrado satisfaz o critério das distâncias (cortesia de P. Kraulis).

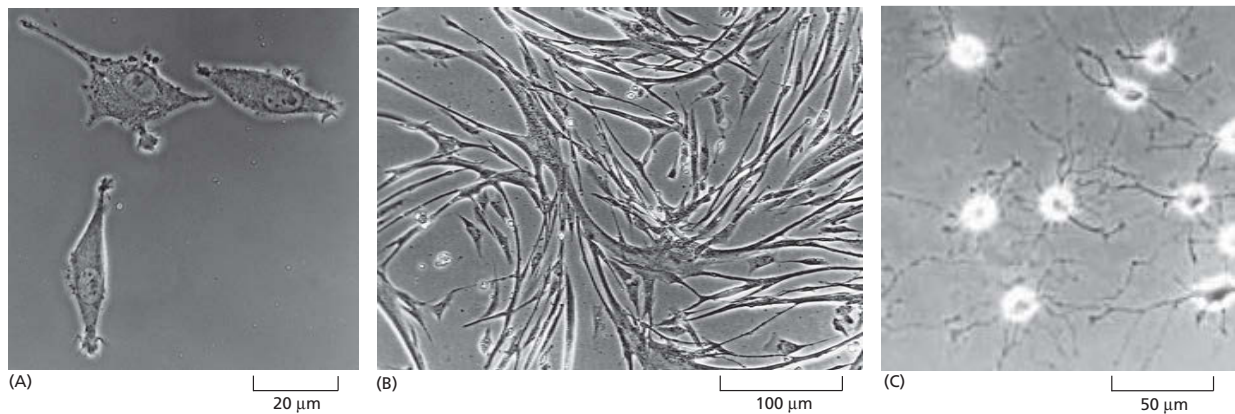
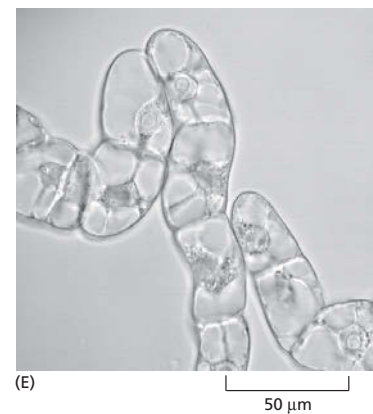
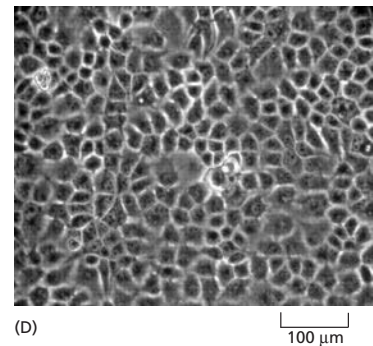



Figura 4-48 Células em cultura frequentemente apresentam características que refletem a sua origem. (A) Micrografia de contraste de fase de fibroblastos em cultura. (B) Micrografia de uma cultura de mioblastos, as células precursoras que originam os músculos, mostrando células se fusionando a células musculares multinucleadas. (C) Cultura de células precursoras de oligodendrócitos, as células da glia que sustentam e nutrem os neurônios no cérebro. (D) Células epiteliais em cultura, formando lâminas. (E) Células de tabaco, de uma linhagem imortal, cultivada em cultura. (A, cortesia de Daniel Zicha; B, cortesia de Rosalind Zalin; C, de Tang *et. al.*, *J. Cell Biol.* 148:971-984, 2000, com permissão de The Rockefeller University Press; D, de K.B. Chua *et. al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:11424-11429, 2007, com permissão da National Academy of Sciences; E, cortesia de Gethin Roberts.)

formam sinapses com outras células nervosas, e células epiteliais formam grandes lâminas com diversas propriedades de um epitélio intacto (**Figura 4-48**). Como esses fenômenos ocorrem em cultura, em um ambiente controlado, eles são acessíveis ao estudo, de maneiras muitas vezes impossíveis nos tecidos intactos. Por exemplo, células em cultura podem ser expostas a hormônios ou fatores de crescimento, e o efeito que essas moléculas têm sobre a forma ou o comportamento das células – ou sobre as proteínas que elas produzem – pode ser facilmente explorado.

As células em cultura são também uma fonte rápida de material para biólogos interessados na purificação e no estudo de proteínas específicas, ou em complexos proteicos, como veremos a seguir.

Técnicas de purificação permitem a obtenção de preparados homogêneos de proteínas a partir de homogenatos de células

Seja a partir de fibroblastos em cultura, de um pedaço de fígado ou de um conjunto de células alteradas geneticamente para expressar a proteína de interesse, a primeira etapa em qualquer procedimento de purificação é o rompimento dessas células para a liberação do seu conteúdo; a suspensão resultante é chamada de *homogenato celular*. Esse rompimento físico é seguido por um procedimento inicial de fracionamento para o isolamento das moléculas de interesse – por exemplo, todas as proteínas solúveis presentes na célula (**Painel 4-4**, p. 164-165).

Uma vez que esse conjunto de proteínas esteja disponível, inicia-se o processo de isolamento da proteína de interesse. O método mais utilizado envolve a purificação da proteína por meio de uma série de etapas **cromatográficas**, que separam os componentes individuais de uma mistura complexa em várias porções, ou frações. Após cada etapa, é necessário utilizar algum tipo de ensaio – por exemplo, testes de atividade – para determinar as frações que contêm a proteína de interesse. Essas frações são então submetidas a etapas cromatográficas adicionais, até que a proteína desejada seja obtida na forma purificada. As formas mais populares na cromatografia de proteínas para a separação de polipeptídeos se baseia na separação por tamanho e carga e na habilidade de ligação a compostos químicos específicos (**Painel 4-5**, p. 166). Se os anticorpos que reconhecem uma proteína específica estiverem disponíveis, eles podem ser utilizados

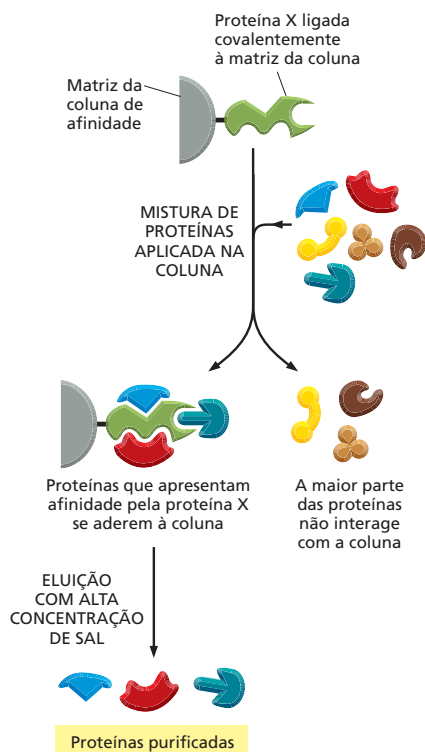



Figura 4-49 A cromatografia de afinidade pode ser utilizada para isolar proteínas que apresentam afinidade pela proteína de interesse. A proteína de interesse, já purificada, aqui representada como proteína X, é ligada covalentemente à matriz da coluna cromatográfica. Um extrato contendo uma mistura de proteínas é aplicado na coluna. As proteínas que se associam à proteína X no interior da célula irão se ligar a ela na coluna. As proteínas que não interagem com a proteína X irão passar pela coluna, e as proteínas ligadas à proteína X poderão ser eluídas com alterações no pH ou na composição iônica do tampão de lavagem.

para auxiliar a extração de uma proteína a partir de uma mistura (ver Painel 4-3, p. 144-145).

Um método similar pode ser utilizado para isolar as proteínas que interagem fisicamente com a proteína em estudo. Nesse caso, a proteína de interesse, na forma purificada, é ligada a uma matriz na coluna cromatográfica; as proteínas que interagem com essa proteína específica serão aderidas à coluna, podendo ser eluídas posteriormente com a alteração dos compostos utilizados na solução de lavagem da coluna (Figura 4-49).

Proteínas também podem ser separadas por **eletroforese**. Nessa técnica, uma mistura de proteínas é aplicada em um polímero na forma de gel e submetida a um campo elétrico; os polipeptídeos então migrarão através do gel em diferentes velocidades, dependendo do seu tamanho e da sua carga total (Painel 4-6, p. 167). Caso muitas proteínas estejam presentes na amostra, ou se elas apresentarem uma taxa de migração muito similar, elas podem ser mais bem resolvidas em uma etapa subsequente, utilizando a técnica de eletroforese bidimensional em gel (ver Painel 4-6). Esses métodos com base em eletroforese geram um número de bandas que podem ser visualizados por coloração, e cada banda corresponde a uma proteína diferente. A eletroforese e a cromatografia – cada uma desenvolvida há mais de 50 anos – têm sido essenciais na compreensão de como as proteínas são e como se comportam (Tabela 4-2). Ambas as técnicas são ainda muito utilizadas na rotina de laboratórios.

Uma vez que uma proteína tenha sido obtida na forma pura, ela pode ser utilizada em ensaios bioquímicos para se estudar em detalhes a sua atividade; pode ser submetida a técnicas de determinação da sua sequência de aminoácidos e da sua estrutura terciária (ver Como Sabemos, p. 158-160).

TABELA 4-2 Marcos históricos no entendimento de proteínas

1838	O nome "**proteína**" (do grego *proteios* – primário) é sugerido por Berzelius para designar as substâncias complexas, ricas em nitrogênio, descobertas nas células de todos os animais e plantas.
1819-1904	A maioria dos 20 **aminoácidos** de ocorrência mais comum nas proteínas é descoberta.
1864	Hoppe-Seyler cristaliza e batiza a **hemoglobina**.
1894	Fisher propõe a analogia **chave-fechadura** para as interações entre enzima e substrato.
1897	Buchner e Buchner mostram que extratos de células de fungo podem realizar a fermentação de sacarose, formando dióxido de carbono e etanol, o que originou a base da **enzimologia**.
1926	Summer cristaliza urease na sua forma pura, demonstrando que proteínas podem possuir atividade catalítica de enzimas; Svedberg desenvolve a primeira **ultracentrífuga analítica** e a usa para estimar o peso molecular correto da hemoglobina.
1933	Tiselius introduz o uso de **eletroforese** para separar proteínas em solução.
1934	Bernal e Crowfoot apresentam os primeiros padrões de **difração de raios X** detalhados de uma proteína, obtidos a partir de cristais da enzima pepsina.
1942	Martin e Synge desenvolvem a **cromatografia**, técnica hoje largamente utilizada para separar proteínas.
1951	Pauling e Corey propõem a estrutura da conformação helicoidal de uma cadeia de aminoácidos – a **α-hélice** – e a estrutura da **folha β**, ambas posteriormente descobertas em muitas proteínas.
1955	Sanger determina a **sequência de aminoácidos da insulina**, a primeira proteína a ter sua sequência de aminoácidos determinada.
1956	Ingram produz a primeira "**impressão digital**" **de uma proteína**, mostrando que a diferença entre a hemoglobina falciforme e a normal se deve à mudança de um único aminoácido (**Animação 4.12**).
1960	Kendrew descreve a primeira **estrutura tridimensional** detalhada de uma proteína (a mioglobina de esperma de baleia), com uma resolução de 0,2nm; Perutz propõe uma estrutura de melhor resolução para a hemoglobina.
1963	Monod, Jacob e Changeux reconhecem que muitas enzimas são reguladas por **modificações alostéricas** em suas conformações.

Grandes quantidades de qualquer proteína podem ser produzidas por meio de técnicas de engenharia genética

Avanços nas técnicas de engenharia genética permitem hoje a produção de grandes quantidades de qualquer proteína desejada. Além de facilitar a purificação de proteínas específicas, a habilidade de obtenção de grandes quantidades de proteínas originou toda uma industria biotecnológica (**Figura 4-50**). Atualmente, as companhias utilizam bactérias, leveduras ou culturas de células de mamíferos para produzir diversos tipos de proteínas de uso terapêutico, como insulina, fator de crescimento humano, bem como fármacos que aumentam a fertilidade, utilizados para induzir a produção de óvulos nas mulheres para o procedimento de fertilização *in vitro*. O preparo dessas proteínas costumava requerer a coleta e o processamento de grandes quantidades de tecidos e outros produtos biológicos – incluindo, no caso de fármacos que aumentam a fertilidade, a urina de freiras na menopausa.

Utilizando as mesmas técnicas de engenharia genética, cientistas desenvolveram proteínas que desempenham novas funções: metabolismo de produtos tóxicos, síntese de fármacos ou que são ativas em condições que normalmente destruiriam a maior parte dos catalisadores biológicos. Discutiremos esses métodos em mais detalhes no Capítulo 10.

Figura 4-50 Companhias de biotecnologia produzem grandes quantidades de proteínas de aplicação prática. Na fotografia, é mostrado um fermentador utilizado para o crescimento de células necessárias para a produção de proteínas em larga escala. (Cortesia de Bioengineering AG, Suíça.)

Estudos automatizados em larga escala da estrutura e da função de proteínas estão aumentando o ritmo das descobertas

Foi feito um enorme progresso no entendimento da estrutura e da função de proteínas nos últimos 150 anos (ver Tabela 4-2, p. 162). Esses avanços são fruto de décadas de pesquisas no isolamento de proteínas, desenvolvidas com o trabalho incansável de cientistas sobre proteínas, ou sobre famílias de proteínas, algumas vezes ao longo de toda a sua carreira. Muitos avanços futuros podem vir da **proteômica**, o estudo em larga escala das proteínas celulares em que a atividade e a estrutura de centenas – e até milhares – de proteínas são analisadas por meio de técnicas automatizadas e altamente sensíveis. Se os cientistas aperfeiçoarem esses métodos, algum dia poderá ser possível monitorar todas as proteínas presentes em uma célula, observando quando estão ativas (ou inativas) e quais estão associadas, tudo em um único experimento.

Análises em larga escala de estruturas proteicas já estão sendo realizadas. Técnicas foram desenvolvidas e automatizadas, permitindo aos pesquisadores clonar genes, produzir proteínas, cultivar cristais e coletar dados de cristalografia por raios X rapidamente e para centenas de proteínas de uma só vez. Por meio da **cristalografia por raios X** e da **espectroscopia por ressonância magnética nuclear** (ver **Como Sabemos**, p. 160), atualmente conhecemos a estrutura de mais de 20.000 proteínas. Essas estruturas estão arquivadas em grandes bancos de dados públicos (**Animação 4.13**).Pela análise da conformação dessas proteínas, os biólogos concluíram que a maior parte dos domínios proteicos se enovela em um número limitado de padrões estruturais – talvez em um número tão reduzido como 2.000. As estruturas de cerca de 800 desses padrões de enovelamento de proteínas já foram determinadas. Por meio do estudo desses padrões, os cientistas esperam desenvolver métodos computacionais que permitam a predição da estrutura e da função de uma proteína a partir apenas da sua sequência de aminoácidos.

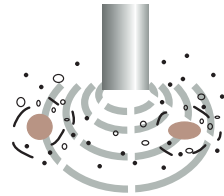
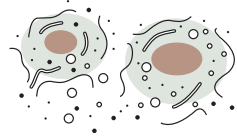
Mesmo com essas informações, ainda será um grande desafio decifrar como exatamente todas essas proteínas – cerca de 400 na menor das bactérias, e 10.000 em uma célula humana típica – atuam em conjunto em uma célula viva. Compreender como as proteínas trabalham para criar e manter uma ordem, em um universo que sempre tende à desordem, irá requerer o desenvolvimento de novas técnicas e grande quantidades de capacidade humana. Quanto mais nos aproximarmos da resposta dessas questões, mais próximos estaremos de compreender as bases fundamentais da vida.

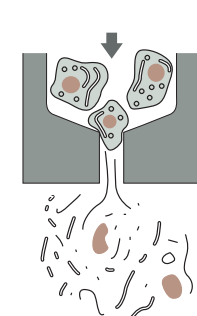
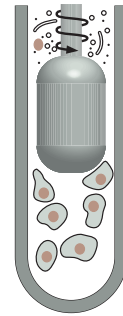
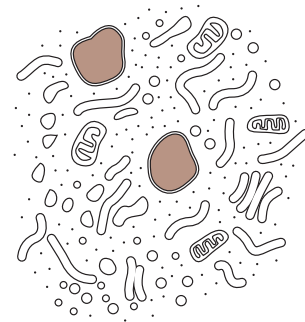
PAINEL 4-4 Lise celular e fracionamento inicial dos extratos celulares

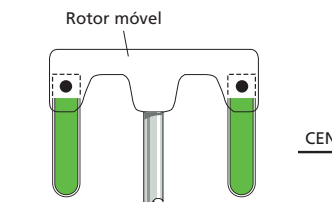
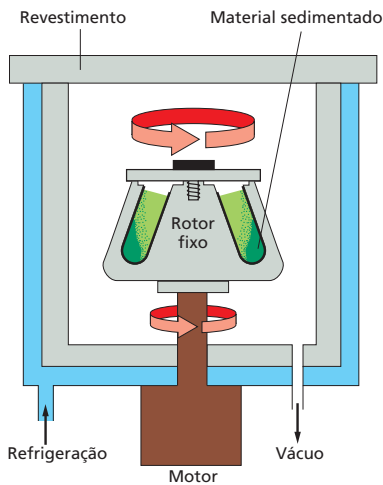
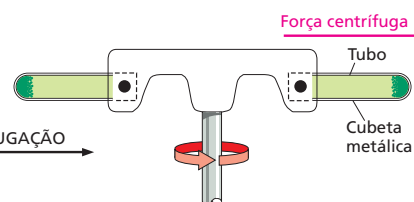
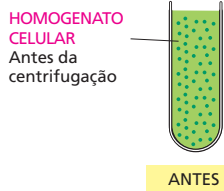
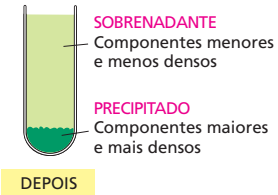
ROMPIMENTO DE CÉLULAS E DE TECIDOS

O primeiro passo na purificação da maioria das proteínas é o rompimento de tecidos e de células de forma controlada.

Usando processos mecânicos suaves, chamados de homogeneização, a membrana plasmática das células pode ser rompida, e os componentes celulares liberados. Os quatro procedimentos mais comuns são mostrados aqui.

A solução resultante (denominada homogenato ou extrato) contém moléculas grandes e pequenas do citosol, como enzimas, ribossomos e metabólitos, bem como as organelas delimitadas por membranas.

1 Lise celular com sons de alta frequência

2 Uso de detergentes suaves para produzir buracos na membrana plasmática

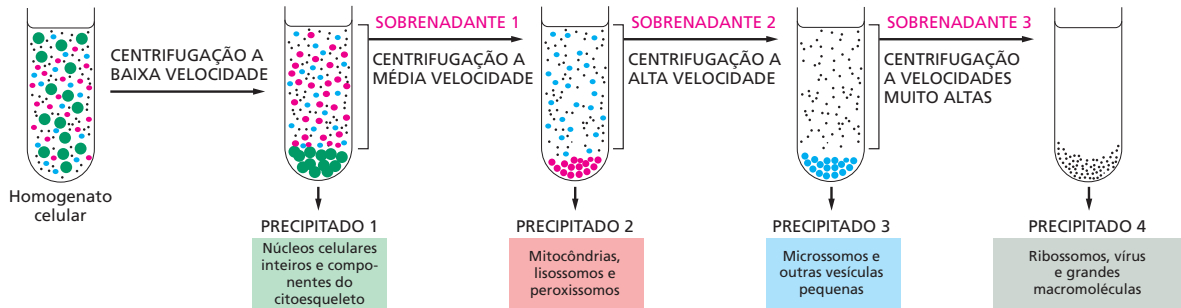
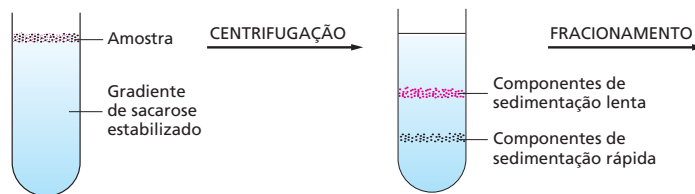
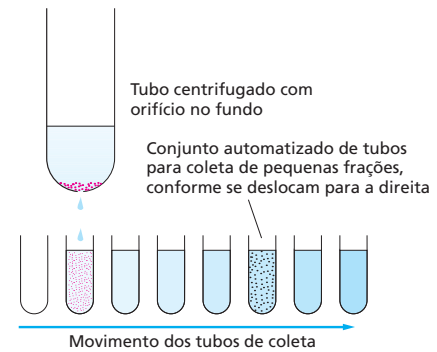
Suspensão de células ou de tecido

3 Passagem das células por um pequeno orifício usando alta pressão

4 Compressão das células entre um êmbolo e as paredes de um tubo de vidro

Quando feita cuidadosamente, a homogeneização mantém intactas a maioria das organelas delimitadas por membranas.

A CENTRÍFUGA

Muitos fracionamentos celulares são feitos em um segundo tipo de rotor, os rotores móveis.

As cubetas metálicas que seguram os tubos são livres para se mover quando o rotor gira.

A centrifugação é o procedimento mais utilizado para a separação do homogenato em diferentes partes, ou frações. O homogenato é colocado em tubos de ensaio e centrifugado em altas velocidades em centrífuga ou ultracentrífuga. Ultracentrífugas atuais chegam a velocidades acima de 100.000 rpm e produzem forças de até 600.000 vezes a força da gravidade.

Essas velocidades requerem que a cuba da centrífuga seja refrigerada e esteja submetida ao vácuo, para que o atrito não aqueça o homogenato. A centrífuga é protegida por um revestimento reforçado, pois um rotor desequilibrado pode explodir violentamente. Rotores fixos suportam volumes maiores do que rotores móveis, porém a formação dos precipitados (a sedimentação do homogenato) é menos uniforme.

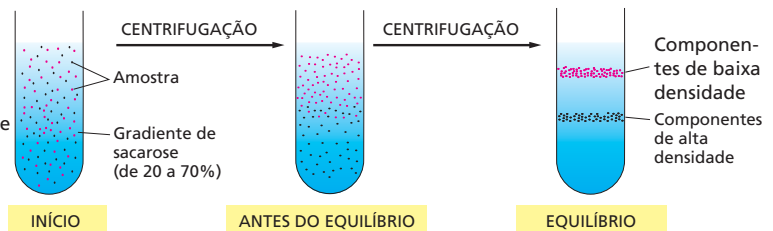
CENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIADA

Centrifugações repetidas e a velocidades progressivamente maiores fracionam o homogenato celular em seus componentes.

A centrifugação separa os componentes celulares por tamanho e densidade. Componentes maiores e mais densos sofrem força centrífuga maior e se movem mais rápido. Esses componentes sedimentam formando um precipitado no fundo do tubo, e os componentes menores e menos densos permanecem em suspensão, na porção chamada de sobrenadante.

VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

Componentes subcelulares sedimentam a diferentes taxas de acordo com seus tamanhos quando inseridos em uma solução salina e centrifugados através dela. A solução contém um gradiente de sacarose que aumenta continuamente em direção ao fundo do tubo; assim, a sedimentação dos componentes pode ser estabilizada. A concentração de sacarose varia de 5 a 20%. Os diferentes componentes celulares são separados em bandas distintas quando sedimentados nesse gradiente de sacarose; as bandas formadas podem ser coletadas individualmente.

Após um tempo de centrifugação apropriado, as bandas podem ser coletadas; a forma mais simples de coletar cada banda é fazer um furo no fundo do tubo plástico centrifugado e coletar os resíduos do fundo, como mostrado aqui.

SEDIMENTAÇÃO EQUILIBRADA

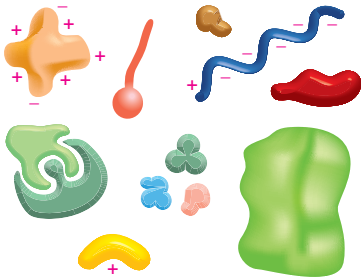
A ultracentrífuga também pode ser utilizada para separar componentes celulares de acordo com sua densidade de flutuação, independentemente do seu tamanho ou da sua forma. A amostra é colocada no topo ou dispersada no interior de um meio com gradiente de densidade contendo altas concentrações de sacarose ou cloreto de césio. Cada componente subcelular se desloca para cima ou para baixo durante a centrifugação e se estabiliza quando a sua densidade se equilibra com a do meio circundante. Uma série de bandas distintas é formada, e aquelas mais próximas do fundo do tubo contêm os componentes com maior densidade de flutuação. Esse método também é chamado de centrifugação por gradiente de densidade.

A amostra é distribuída pelo gradiente de densidade de sacarose.

No equilíbrio, os componentes migraram até a região onde sua densidade é igual ao do gradiente do meio.

Um gradiente de sacarose é mostrado aqui, mas gradientes mais densos podem ser feitos com cloreto de césio, particularmente útil quando se pretende separar ácidos nucleicos (DNA ou RNA).

As bandas finais podem ser coletadas a partir da base do tubo, como mostrado anteriormente.

PAINEL 4-5 Separação de proteínas por cromatografia

SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS

Proteínas são muito diversas. Elas diferem em tamanho, forma, carga, hidrofobicidade e afinidade por outras moléculas. Todas essas propriedades podem ser utilizadas para separar proteínas umas das outras para que possam ser estudadas individualmente.

COLUNAS DE CROMATOGRAFIA

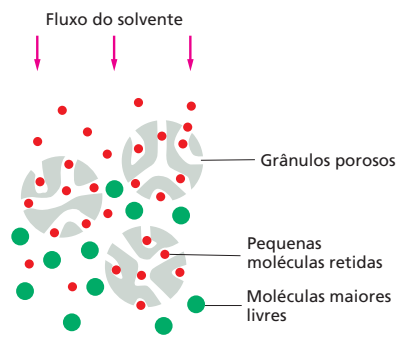
Proteínas são geralmente fracionadas em colunas de cromatografia. Uma solução contendo uma mistura de proteínas é aplicada no topo de uma coluna cilíndrica com uma matriz sólida e permeável imersa em solvente. Passa-se então uma grande quantidade de solvente através da coluna. Como diferentes proteínas interagem de forma diferente com a matriz, elas podem ser coletadas separadamente conforme passam pela coluna. A matriz pode ser escolhida conforme a característica escolhida para separar as proteínas: carga, hidrofobicidade, tamanho ou afinidade por determinados grupos químicos (ver *a seguir*).

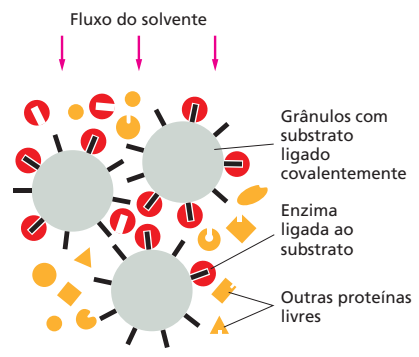
TRÊS TIPOS DE CROMATOGRAFIA

Apesar de o material que compõe a coluna de cromatografia variar, ele geralmente é empacotado na coluna na forma de pequenos grânulos. Uma estratégia típica de purificação de proteínas pode empregar cada um dos três tipos de matrizes aqui descritas, resultando em um produto final purificado 10.000 vezes.

A pureza pode ser facilmente avaliada por eletroforese em gel (ver Painel 4-6).

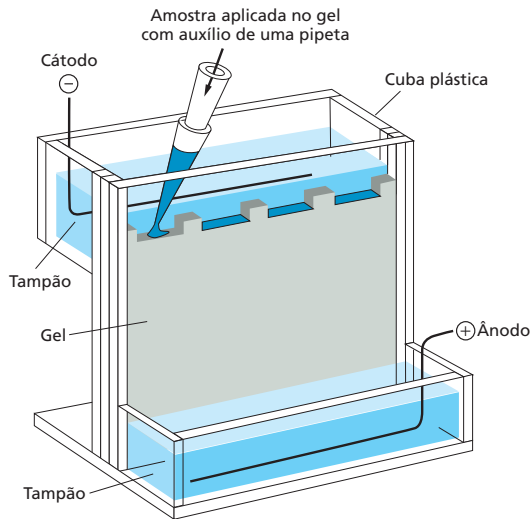
(A) CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

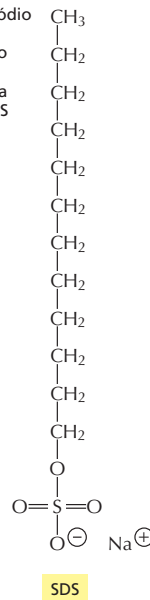
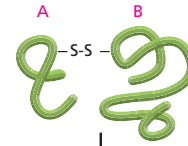
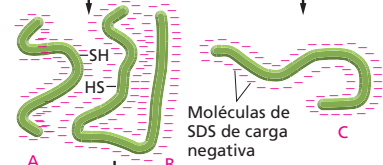
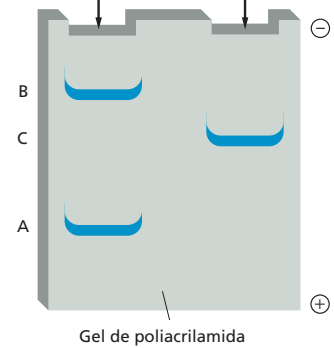
Colunas de troca iônica são empacotadas com pequenos grânulos de carga positiva ou negativa que retêm proteínas com a carga oposta. A associação entre a proteína e a matriz depende do pH e da concentração iônica da solução passada pela coluna. Esses parâmetros podem ser variados de forma controlada para que se obtenha uma separação mais efetiva.

(B) CROMATOGRAFIA DE GEL-FILTRAÇÃO

Colunas de gel-filtração separam proteínas de acordo com seus tamanhos. A matriz é constituída por pequenos grânulos porosos. Moléculas de proteína pequenas o suficiente para entrar nos poros dos grânulos difundem mais lentamente pela coluna. Proteínas maiores que não entram nos grânulos são eluídas mais rapidamente da coluna. Essas colunas também permitem uma estimativa do tamanho da proteína.

(C) CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

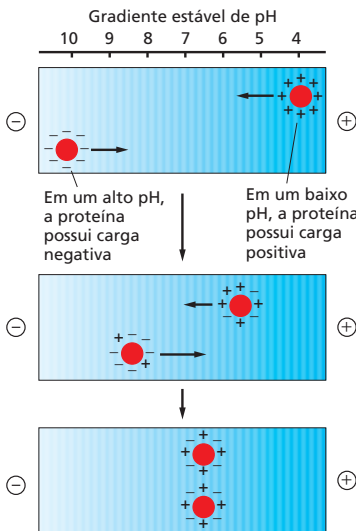
Colunas de afinidade contêm matrizes covalentemente ligadas a moléculas que interagem especificamente com a proteína de interesse (p. ex., um anticorpo ou o substrato de uma enzima). A proteína se liga especificamente à coluna e é depois eluída por mudança de pH ou concentração salina; o resultado é uma proteína altamente purificada.

PAINEL 4-6 Separação de proteínas por eletroforese

ELETROFORESE EM GEL

Quando um campo elétrico é aplicado em uma solução contendo moléculas proteicas, o tamanho e a carga das moléculas influenciam a direção para onde migram e a que velocidade. Essa é a base da técnica de eletroforese.

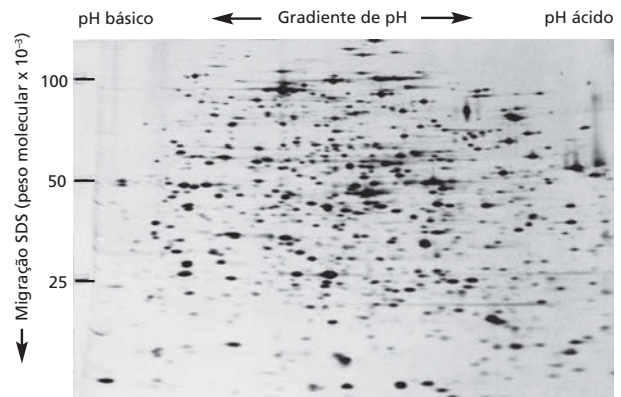
O detergente sódio dodecil sulfato (SDS) é utilizado para solubilizar proteínas para a eletroforese SDS em gel de poliacrilamida.

Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) Cadeias polipeptídicas formam um complexo com moléculas negativamente carregadas de sódio dodecil sulfato (SDS), migrando pelos poros do gel de poliacrilamida como um complexo SDS-proteína de carga negativa. O aparato utilizado nessa técnica é mostrado acima (à esquerda). Um agente redutor (mercaptoetanol) é adicionado para romper as pontes S-S em uma mesma cadeia polipeptídica ou entre duas proteínas. Nessas condições, a proteína migra em uma velocidade que reflete seu peso molecular.

FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA

Cada proteína possui um determinado valor de pH, chamado de ponto isoelétrico, em que ela não possui carga total; nesse ponto, ela não se move quando submetida a um campo elétrico.
Na focalização isoelétrica, proteínas são submetidas à eletroforese em um capilar preenchido por poliacrilamida e onde um gradiente de pH é estabelecido por uma mistura de tampões específicos. Cada proteína migra até o gradiente correspondente ao seu ponto isoelétrico, onde permanece imóvel.

O ponto isoelétrico dessa proteína é 6,5.

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Misturas complexas de proteínas não podem ser bem separadas em géis unidimensionais, mas a eletroforese bidimensional em gel, combinando dois métodos de separação, pode ser utilizada para separar até 1.000 proteínas em um mapa bidimensional. Na primeira etapa, as proteínas são separadas no gel em função das suas cargas elétricas, por meio da focalização isoelétrica (ver à *esquerda*). Na segunda etapa, o gel é submetido a uma SDS-PAGE (ver *acima*) na direção perpendicular à da primeira etapa. Cada proteína migra formando bandas.

Todas as proteínas da bactéria *E. coli* estão separadas neste gel 2D; cada banda corresponde a uma cadeia polipeptídica diferente. Elas estão separadas de acordo com seus pontos isoelétricos, da esquerda para a direita, e peso molecular, de cima para baixo. (Cortesia de Patrick O'Farrel.)

CONCEITOS ESSENCIAIS

- As células vivas contêm uma grande diversidade de proteínas, cada uma composta por uma cadeia linear de aminoácidos ligados covalentemente.
- Cada tipo de proteína possui uma sequência única de aminoácidos que determina a sua estrutura e atividade biológica.
- A estrutura enovelada de uma proteína é estabilizada por interações não covalentes entre diferentes partes da cadeia polipeptídica.
- As pontes de hidrogênio entre regiões adjacentes da cadeia principal podem originar os motivos estruturais regulares conhecidos como α-hélices e folhas β.
- A estrutura de muitas proteínas pode ser subdividida em regiões menores de estrutura tridimensional compacta, conhecidas como domínios proteicos.
- A função biológica de uma proteína depende das propriedades químicas da sua superfície e de como ela se liga a outras moléculas, chamadas de ligantes.
- Quando uma proteína catalisa a formação ou a clivagem de uma ligação covalente em um ligante, ela é denominada enzima, e o ligante é denominado substrato.
- No sítio ativo de uma enzima, as cadeias laterais dos aminoácidos estão precisamente arranjadas para favorecer a formação dos estados de transição de alta energia, pelos quais o substrato deve passar para que possa ser convertido em produto.
- A estrutura tridimensional de muitas proteínas evoluiu de forma que a ligação de um pequeno ligante possa induzir mudanças significativas na sua forma.
- Muitas enzimas são proteínas alostéricas que existem em duas conformações, diferindo na sua atividade catalítica, e a enzima pode ser ativada e inibida por moléculas que se ligam a sítios regulatórios distintos, estabilizando tanto a sua conformação ativa quanto a inativa.
- A atividade de muitas enzimas no interior da célula é extremamente regulada. Uma das formas mais comuns de regulação é a retroalimentação negativa, em que uma enzima de uma via metabólica é inibida pelo produto final dessa via.
- Milhares de enzimas, em uma célula eucariótica típica, são reguladas por ciclos de fosforilação e desfosforilação, ou pela ligação e hidrólise de GTP nas proteínas ligadoras de GTP.
- A hidrólise de ATP à ADP pelas proteínas motoras produz movimentos coordenados nas células.
- As máquinas proteicas altamente eficientes são formadas por agregados de proteínas nos quais mudanças conformacionais são coordenadas para desempenhar funções celulares complexas.
- O código regulatório das proteínas, com base em modificações covalentes de múltiplas cadeias laterais de aminoácidos, permite que as células controlem a localização e a formação de complexos proteicos.
- A partir de extratos brutos de homogenatos celulares, proteínas individuais podem ser obtidas na forma purificada utilizando séries de etapas cromatográficas. O processo de purificação permite que propriedades detalhadas da proteína sejam reveladas por meio de técnicas bioquímicas e que sua estrutura tridimensional exata seja determinada.

TERMOS-CHAVE

sítio ativo
alostérica
α-hélice
sequência de aminoácidos
anticorpo
antígeno
folha β
sítio de ligação
cromatografia
espira enrolada (*coiled-coil*)
conformação
ponte dissulfeto
eletroforese
enzima
retroalimentação negativa
proteína fibrosa
proteína globular
proteína ligadora de GTP
hélice
ligante
proteína motora
espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN)
polipeptídeo, cadeia polipeptídica
cadeia principal polipeptídica
proteína
domínio proteico
família de proteínas
proteína-cinase
máquina proteica
proteína-fosfatase
fosforilação proteica
proteômica
proteína reguladora
estrutura secundária
cadeia lateral
subunidade
estado de transição
cristalografia por raios X

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 4-10

Quais das seguintes afirmações estão corretas? Justifique suas respostas.

A. O sítio ativo de uma enzima geralmente ocupa uma pequena porção da sua superfície.
B. Em algumas enzimas, a catálise envolve a formação de uma ligação covalente entre a cadeia lateral de um de seus aminoácidos e a molécula de substrato.
C. Uma folha β pode conter até 5 unidades, e não mais.
D. A especificidade de um anticorpo está contida exclusivamente nas voltas da superfície do domínio enovelado da cadeia leve.
E. A possibilidade de arranjos lineares de aminoácidos é tamanha que raramente ocorre a evolução de uma proteína a partir de outra preexistente.
F. Enzimas alostéricas possuem dois ou mais sítios de ligação.
G. Ligações não covalentes são fracas demais para afetar a estrutura tridimensional de macromoléculas.
H. A cromatografia de afinidade separa moléculas de acordo com sua carga intrínseca.
I. Na centrifugação de um homogenato celular, organelas menores sofrem menos atrito, sedimentando mais rapidamente do que organelas maiores.

QUESTÃO 4-11

Que características comuns das α-hélices e das folhas β fazem delas os motivos universais da estrutura de proteínas?

QUESTÃO 4-12

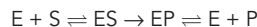
A estrutura de proteínas é determinada apenas pela sua sequência de aminoácidos. Uma proteína cuja ordem dos seus aminoácidos é artificialmente invertida terá a mesma estrutura da proteína original?

QUESTÃO 4-13

Considere a seguinte sequência de uma α-hélice: Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Asp-Ile-Leu-Ser-Arg-Leu-Phe-Lys-Val. Quantos giros terá essa hélice? Você vê algo notável no arranjo de aminoácidos dessa sequência, quando enovelada em uma hélice? (Dica: consulte as propriedades dos aminoácidos na Figura 4-3.)

QUESTÃO 4-14

Reações enzimáticas simples geralmente ocorrem conforme a equação:

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow EP \rightleftharpoons E + P$$

onde E, S e P são enzima, substrato e produto, respectivamente.

A. O que ES representa nessa equação?
B. Por que o primeiro passo é mostrado com uma seta bidirecional e o segundo com uma seta unidirecional?
C. Por que E aparece no início e no fim da equação?
D. Frequentemente, uma alta concentração de P inibe a enzima. Sugira o porquê disso ocorrer.
E. Um composto X se parece com S e se liga ao sítio ativo da enzima, mas não sofre a reação que ela catalisa. Que efeitos você espera observar quando X é adicionado à reação? Compare os efeitos de X aos do acúmulo de P.

QUESTÃO 4-15

Quais dos seguintes aminoácidos você espera encontrar com maior frequência no centro de uma proteína globular enovelada? E quais você espera encontrar com maior frequência expostos ao exterior? Justifique suas respostas. Ser, Ser-P (serina fosforilada), Leu, Lys, Gln, His, Phe, Val, Ile, Met, Cys-S-S-Cys (duas cisteínas unidas por uma ponte dissulfeto) e Glu. Onde você espera encontrar os aminoácidos N e C-terminal?

QUESTÃO 4-16

Assuma que você deseja produzir e estudar fragmentos de uma proteína. Você espera que algum dos fragmentos da cadeia polipeptídica se enovele da mesma maneira que a sequência correspondente na proteína intacta? Considere a proteína mostrada na Figura 4-16. Quais dos fragmentos têm maior probabilidade de se enovelar corretamente?

QUESTÃO 4-17

Uma enzima isolada de uma bactéria mutante e cultivada a 20 °C é ativa no tubo de ensaio a 20 °C, mas não a 37 °C (37 °C é a temperatura do intestino, onde essa bactéria normalmente vive). Além disso, uma vez que essa enzima é exposta a altas temperaturas, ela não é mais funcional em temperaturas mais baixas. A mesma enzima, isolada de bactérias normais, é ativa nas duas temperaturas. O que você imagina que ocorra com a enzima mutante, em nível molecular, com o aumento da temperatura?

QUESTÃO 4-18

Uma proteína motora se move ao longo de um filamento na célula. Por que os elementos mostrados na ilustração não são suficientes para conferir uma direção ao movimento (**Figura Q4-18**)? Usando como referência a Figura 4-42, adicione a essa ilustração os elementos necessários para tornar o movimento direcionado e justifique cada modificação feita.

Figura Q4-18

QUESTÃO 4-19

A cromatografia por gel-filtração separa moléculas de acordo com seus tamanhos (ver Painel 4-5, p. 166). Em solução, moléculas menores difundem mais rapidamente do que moléculas maiores; na coluna de gel-filtração, moléculas menores migram mais devagar do que moléculas maiores. Explique esse paradoxo. O que aconteceria com taxas de fluxo muito rápidas?

QUESTÃO 4-20

Tanto a α-hélice quanto a espiral enrolada formada a partir da hélice são estruturas helicoidais. Elas possuem a mesma orientação (refere-se à Figura 4-11)?

QUESTÃO 4-21

Como é possível que uma alteração em um único aminoácido, em uma proteína composta por 1.000 aminoácidos, destrua a sua função, mesmo que esse aminoácido modificado ocupe uma posição distante do sítio ativo da enzima?

CAPÍTULO 5

DNA e Cromossomos

A vida depende da capacidade das células em armazenar, recuperar e traduzir as instruções genéticas necessárias para produzir e manter o organismo vivo. Essa informação hereditária é passada de uma célula para a célula-filha durante a divisão celular e de geração em geração dos organismos por meio de suas células reprodutivas. Essas instruções são armazenadas dentro de cada célula viva em seus *genes* – os elementos que contêm as informações que determinam as características de uma espécie como um todo e de cada indivíduo.

No início do século XX, quando a genética surgiu como uma ciência, os cientistas ficaram intrigados com a natureza química dos genes. A informação nos genes é copiada e transmitida de uma célula para a célula-filha milhões de vezes durante a vida de um organismo multicelular e sobrevive a esse processo sem alteração. Que tipo de molécula poderia ser capaz de tal replicação tão acurada ilimitada, bem como ser capaz de dirigir o desenvolvimento do organismo e a vida diária de uma célula? Que tipos de instruções estão contidos na informação genética? Como essas instruções estão fisicamente organizadas de modo que a grande quantidade de informação necessária para o desenvolvimento e a manutenção, mesmo do mais simples organismo, possa estar contida em um espaço tão pequeno de uma célula?

As respostas para algumas dessas questões surgiram na década de 1940 quando foi descoberto, a partir de estudos com fungos simples, que a informação genética consistia, principalmente, em instruções para a produção de proteínas. As proteínas são macromoléculas que realizam a maioria das funções celulares, atuam como blocos na formação das estruturas celulares, formam as enzimas que catalisam todas as reações químicas celulares, regulam a expressão gênica e permitem que as células se movam e se comuniquem umas com as outras. É difícil imaginar que outro tipo de instruções a informação genética poderia conter.

O outro avanço crucial que ocorreu na década de 1940 foi o reconhecimento de que o ácido desoxirribonucleico (DNA) era, provavelmente, o por-

tador dessa informação genética. O mecanismo pelo qual a informação hereditária era copiada para ser transmitida de célula para célula e como as proteínas eram especificadas pelas instruções do DNA permaneceu um mistério até 1953, quando foi determinada a estrutura do DNA por James Watson e Francis Crick. A estrutura revelou imediatamente como o DNA pode ser copiado ou replicado e forneceu os primeiros indícios a respeito de como a molécula de DNA pode codificar as instruções para a produção de proteínas. Hoje, o fato de que o DNA é o material genético é tão fundamental para o pensamento biológico que é difícil perceber o enorme espaço intelectual que foi preenchido por essa descoberta.

Neste capítulo, iniciaremos descrevendo a estrutura do DNA. Veremos como, apesar de sua simplicidade química, a estrutura e as propriedades químicas do DNA o tornam apropriado como material básico dos genes. Os genes de cada célula na Terra são feitos de DNA, e o discernimento a respeito do relacionamento entre o DNA e os genes vieram de experimentos com uma variedade de organismos. Consideraremos como os genes e outros importantes segmentos do DNA estão organizados nas longas moléculas de DNA presente nos cromossomos. Finalmente, discutiremos como as células eucarióticas dobram essas longas moléculas de DNA em cromossomos compactos. Esse empacotamento deve ser realizado de forma ordenada de modo que os cromossomos possam ser replicados e divididos corretamente entre as duas células-filhas em cada divisão celular. A estrutura deve permitir o acesso, ao DNA cromossomal, de enzimas de reparo, para que possam realizar sua função quando o mesmo se encontra danificado, e de proteínas especializadas que controlam a expressão de seus muitos genes.

Este é o primeiro de cinco capítulos que tratarão dos mecanismos genéticos básicos, o modo pelo qual as células replicam, reparam, expressam e ocasionalmente melhoram a informação genética contida em seu DNA. A totalidade dessa informação em cada célula é denominada *genoma*. No Capítulo 6, discutiremos os mecanismos pelos quais as células replicam e reparam precisamente seu DNA e também descreveremos como as sequências de DNA podem ser reorganizadas por meio do processo de recombinação gênica. A expressão gênica, o processo pelo qual a informação codificada no DNA é interpretada pela célula para coordenar a síntese proteica, é principal assunto do Capítulo 7. No Capítulo 8, descreveremos como a expressão gênica é controlada pela célula para assegurar que cada uma das milhares de proteínas codificadas no DNA seja produzida no tempo e no local apropriados durante a vida da célula. Passaremos a discutir no Capítulo 9 como os genes atuais e o genoma evoluíram e seus ancestrais. Uma série de técnicas experimentais usadas para estudar o DNA e o seu papel nesses processos celulares fundamentais será apresentada no Capítulo 10.

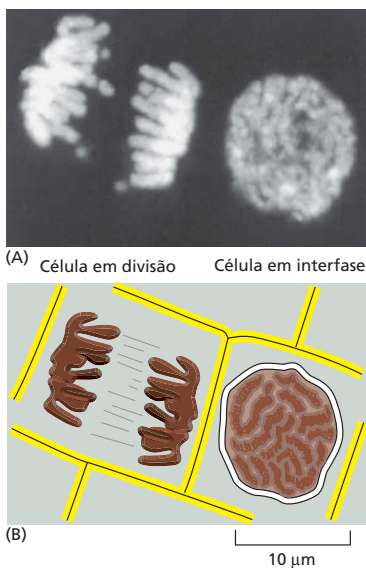



Figura 5-1 Os cromossomos se tornam visíveis quando a célula se prepara para dividir-se. (A) Duas células vegetais adjacentes fotografadas com microscópio de luz direta. O DNA foi corado com um corante fluorescente que se liga a ele (DAPI). O DNA está presente nos cromossomos, os quais se tornam visíveis como estruturas distintas ao microscópio de luz direta somente quando formam estruturas compactas na preparação para a divisão celular, como mostra a fotografia da *esquerda*. A célula à *direita*, a qual não está em divisão, contém os mesmos cromossomos. Eles não podem ser distinguidos em cromossomos individuais ao microscópio de luz direta nessa fase do ciclo celular porque seu DNA está em uma conformação muito mais relaxada. (B) Diagrama esquemático das duas células com seus cromossomos. (A, cortesia de Peter Shaw).

A ESTRUTURA E A FUNÇÃO DO DNA

Muito antes de que os biólogos entendessem a estrutura do DNA, eles haviam reconhecido que as características hereditárias e os genes que as determinam estavam associados aos cromossomos. Os cromossomos (assim denominados do grego *chroma*, "cor", por suas propriedades de coloração), foram descobertos no século XIX como estruturas em forma de cordão do núcleo das células eucarióticas que se tornavam visíveis quando as células começavam a dividir-se (**Figura 5-1**). Quando foi possível realizar uma análise bioquímica, os pesquisadores descobriram que os cromossomos continham o DNA e proteínas. No entanto, ainda não estava claro qual desses componentes codificava a informação genética dos organismos.

Agora sabemos que o DNA contém a informação hereditária das células e que as proteínas que compõem os cromossomos atuam principalmente para compactar e controlar essas enormes moléculas de DNA. No entanto, os biólogos na década de 1940 tinham dificuldade em aceitar que o DNA conti-

nha o material genético em virtude da sua aparente simplicidade química (ver **Como Sabemos**, p. 174-176). Acreditava-se que o DNA era apenas um longo polímero composto de somente quatro tipos de subunidades quimicamente muito similares.

Então, no início da década de 1950, o DNA foi examinado pela análise de difração de raios X, uma técnica para determinar a estrutura atômica tridimensional de uma molécula (discutido no Capítulo 4, p. 158-160). Os primeiros resultados da difração de raios X indicaram que o DNA era composto de duas fitas torcidas em uma hélice. A observação de que o DNA era composto por uma fita dupla foi de crucial significância. Ela forneceu uma das principais dicas que levaram, em 1953, ao modelo correto da estrutura do DNA.

Logo após o modelo de Watson-Crick da estrutura do DNA ter sido proposto, o potencial para replicação e codificação da informação se tornou aparente. Nesta seção, discutiremos a estrutura da molécula de DNA e explicaremos em termos gerais como ela é capaz de armazenar a informação hereditária.

A molécula de DNA consiste em duas cadeias nucleotídicas complementares

A molécula de **ácido desoxirribonucleico** (**DNA**) consiste em duas longas cadeias polinucleotídicas. Cada uma dessas *cadeias de DNA* ou *fitas de DNA* é composta de quatro tipos de subunidades de nucleotídeos, e as duas cadeias são unidas por pontes de hidrogênio entre as bases dos nucleotídeos (**Figura 5-2**; ver Painel 2-7, p. 76-77, para uma descrição das pontes de hidrogênio). Como vimos no Capítulo 2 (Painel 2-6, p. 74-75), os nucleotídeos são compostos por um açúcar de cinco carbonos aos quais estão ligados um ou

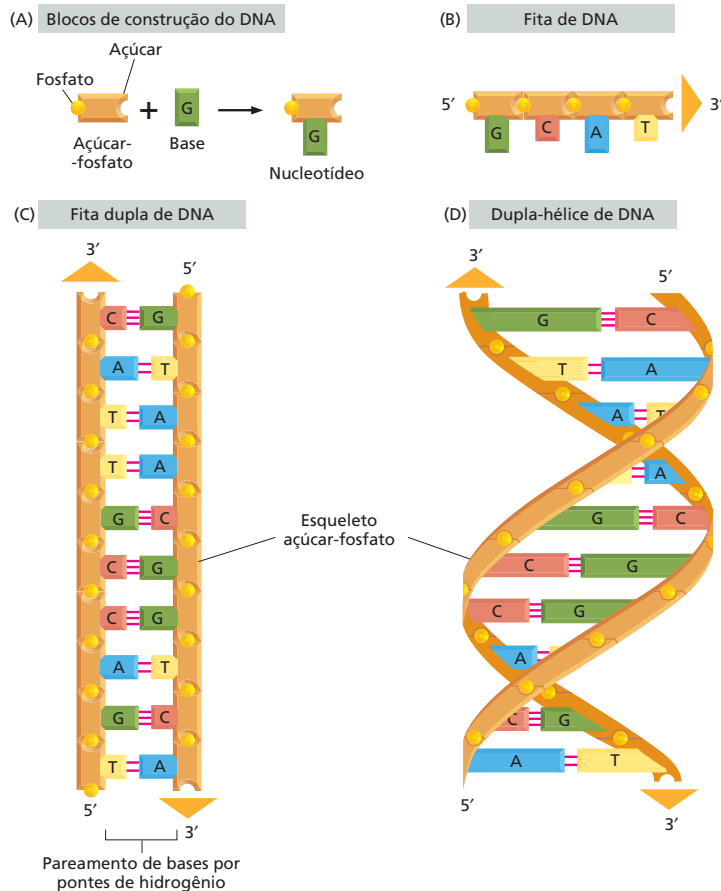



Figura 5-2 O DNA é formado por blocos de construção de quatro nucleotídeos. (A) Cada nucleotídeo é composto de um açúcar-fosfato covalentemente ligado a uma base. (B) Os nucleotídeos são covalentemente ligados em cadeias polinucleotídicas com um esqueleto de açúcar-fosfato de onde as bases (A, C, G e T) se estendem. A molécula de DNA é composta de duas cadeias polinucleotídicas (fitas de DNA) unidas por pontes de hidrogênio entre os pares de bases. As *setas* na fita de DNA indicam a polaridade das duas fitas, as quais são antiparalelas na molécula de DNA. Embora o DNA esteja representado na forma achatada (C), na realidade, ele se torce em uma dupla-hélice (D).

COMO SABEMOS:
OS GENES SÃO FEITOS DE DNA

Em 1920, os cientistas acreditavam que os genes estavam localizados nos cromossomos e sabiam que os cromossomos eram compostos por DNA e proteínas. Em virtude do fato de o DNA ser quimicamente simples, os pesquisadores assumiram naturalmente que os genes tinham de ser feitos de proteínas, as quais eram quimicamente mais diversas. Mesmo quando as evidências dos experimentos sugeriram o contrário, foi difícil de aceitar.

Mensagens dos mortos

O caso do DNA começou a tomar forma no final da década de 1920, quando um médico britânico chamado de Fred Griffith fez uma descoberta fantástica. Ele estava estudando a bactéria *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo), que causa a pneumonia. Como os antibióticos ainda não tinham sido descobertos, a infecção por esse microrganis-

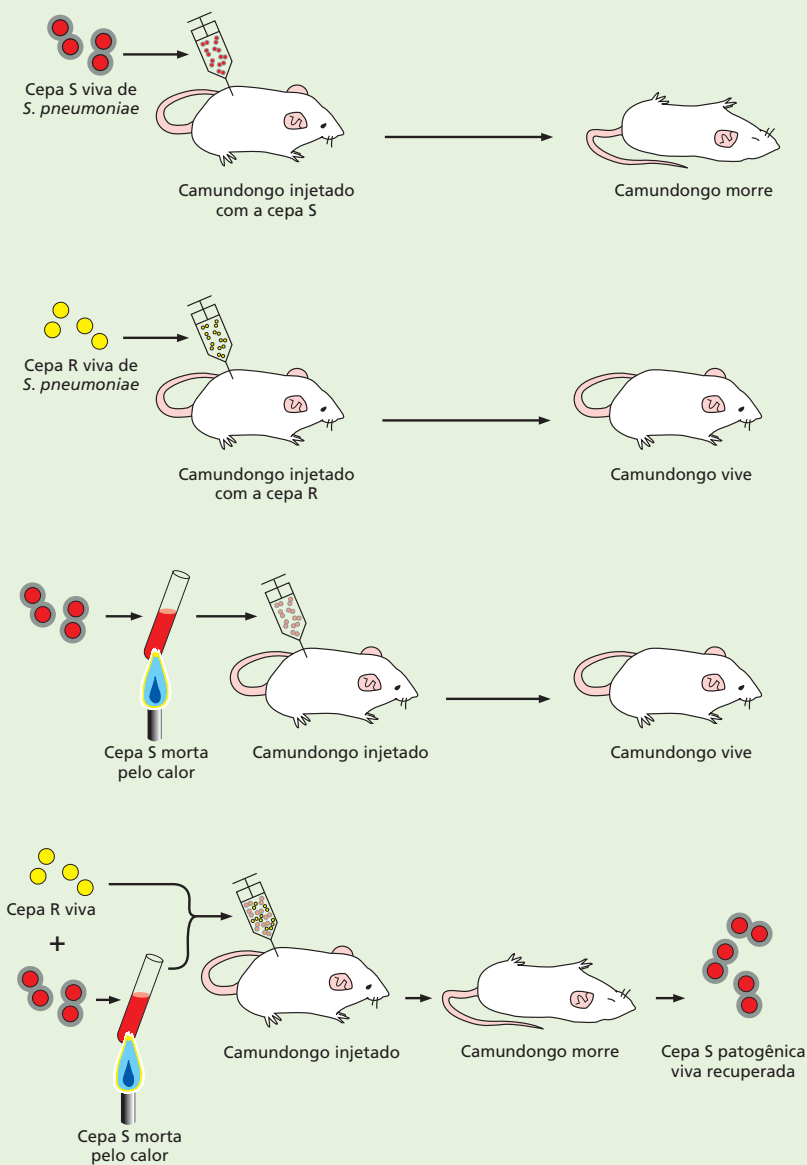



Figura 5-3 Griffith demonstrou que as bactérias mortas pelo calor poderiam transformar células vivas. A bactéria *Streptococcus pneumoniae* apresenta duas formas que diferem por sua aparência ao microscópio e por sua capacidade de causar doença. Células da cepa patogênica, que são letais quando injetadas em camundongos, são encerradas por uma cápsula de polissacarídeo lisa e brilhante. Quando cultivadas em placas, essas bactérias causadoras de doença formam colônias lisas em forma de cúpula, denominadas S (de *smooth* = lisa). A cepa inofensiva de pneumococo, por outro lado, não possui essa cobertura protetora e forma colônias achatadas e rugosas; por isso, a denominação de R (de *rough* = rugosa). Griffith observou que a substância presente na cepa S patogênica poderia mudar permanentemente, ou transformar a cepa R não letal em uma cepa S letal.

mo era normalmente fatal. Quando cultivadas em laboratório, a bactéria tomava duas formas, uma forma *patogênica*, que causava uma infecção letal quando injetada em animais, e uma inofensiva, que era facilmente eliminada pelo sistema imune do animal, sem produzir infecção.

Durante a sua investigação, Griffith injetou várias preparações dessa bactéria em camundongos. Ele mostrou que os pneumococos patogênicos que tinham sido mortos pelo calor não eram capazes de causar infecção. A surpresa veio quando Griffith injetou os dois tipos de células, a patogênica, morta pelo calor, e a bactéria viva inofensiva no mesmo camundongo. Essa mistura mostrou ser uma combinação letal: o animal não somente morreu de pneumonia, mas Griffith viu que seu sangue estava repleto de bactéria viva da forma patogênica (**Figura 5-3**). O pneumococo morto pelo calor tinha, de alguma forma, convertido a bactéria inócua em uma forma letal. Além disso, Griffith observou que as mudanças eram permanentes: ele podia cultivar essas bactérias "transformadas" e elas permaneciam patogênicas. Entretanto, qual era esse material misterioso que tornava a bactéria inofensiva em uma bactéria letal? E como essas mudanças eram passadas para a progênie?

Figura 5-4 **Avery, MacLeod e McCarty demonstraram que o DNA é o material genético.** Esses pesquisadores prepararam um extrato da cepa S causadora de doença e mostraram que o "princípio transformante" que iria mudar permanentemente a cepa de pneumococo R inofensiva na cepa S patogênica era o DNA. Essa foi a primeira evidência de que o DNA poderia servir como material genético.

Fazendo bolhas

As descobertas marcantes de Griffith deram início aos experimentos que iriam fornecer as primeiras evidências de que os genes eram feitos de DNA. Um bacteriologista americano, Oswald Avery, seguindo os trabalhos de Griffith, descobriu que os pneumococos inofensivos poderiam ser transformados em cepas patogênicas em cultura, pela exposição a um extrato preparado com a cepa patogênica. Levou mais 15 anos para que Avery e seus colaboradores, Colin MacLeod e Maclyn McCarty, purificassem com sucesso o "princípio transformante" desse extrato solúvel e para demonstrar que o ingrediente ativo era o DNA. Em virtude do fato de que o princípio transformante causava uma mudança hereditária para a bactéria que o recebia, o DNA deveria ser o material do qual os genes eram feitos.

Os 15 anos de atraso foram, em parte, decorrentes do clima acadêmico e a suposição difundida de que o material genético era constituído por proteínas. Em virtude do potencial das ramificações de seu trabalho, os pesquisadores queriam estar absolutamente certos de que o princípio transformante era o DNA antes de anunciar suas descobertas. Como Avery chamou a atenção em uma carta para seu irmão, também bacteriologista: "É divertido fazer bolhas, mas é mais interessante estourá-las antes que alguém tente fazê-lo". Assim, os pesquisadores submeteram o material a uma bateria de testes químicos (**Figura 5-4**). Eles encontraram que o princípio transformante exibia todas as propriedades químicas características do DNA. Além disso, eles mostraram que as enzimas que destroem proteínas e RNA não afetavam a capacidade de transformar bactérias, e as enzimas que degradavam o DNA inativavam esse material. Os investigadores encontraram que sua preparação purificada alterava permanentemente a bactéria, da mesma forma que Griffith já havia descrito. O DNA das cepas patogênicas era adquirido pelas cepas inofensivas, e essas mudanças eram passadas para as gerações bacterianas subsequentes.

Esse estudo marcante apresentou provas rigorosas de que o DNA purificado poderia atuar como o material genético. No entanto, o trabalho resultante na publicação de 1944 não chamou muito a atenção. Apesar do cuidado meticuloso com que esses experimentos foram conduzidos, os geneticistas não foram imediatamente convencidos de que o DNA era o material hereditário. Muitos argumentavam que a transformação poderia ter sido causada por algum traço de proteína contaminante nas preparações, ou que o extrato poderia conter um mutagênico que alterava o material genético da bactéria inofensiva, convertendo-a na forma patogênica, em vez de conter o material genético.

Coquetel de vírus

O debate não foi definitivamente concluído até 1952, quando Alfred Hershey e Martha Chase iniciaram experimentos em seu laboratório e demonstraram de uma vez por todas que os genes eram feitos de DNA. Os pesquisadores estudavam o T2, um vírus que infecta e, finalmente, destrói a bactéria *E. coli.* Esses vírus que matam bactérias se comportam como pequenas seringas moleculares. Eles injetam seu material genético na célula hospedeira enquanto a cabeça do vírus vazio permanece fora da bactéria infectada (**Figura 5-5A**). Uma vez dentro da célula, os genes virais dirigem a formação de novas partículas virais. Em menos de uma hora, a célula infectada explodia, liberando milhares de novos vírus no meio. Esses, então, infectam as bactérias vizinhas, e o processo se repete.

A beleza do sistema T2 é que esses vírus contêm somente dois tipos de moléculas: DNA e proteínas. Assim, o material genético tem de ser um dos dois, mas qual? O experimento foi razoavelmente direto. Em virtude do fato de os genes virais entrarem na célula bacteriana e o resto da partícula viral permanecer no exterior, os pesquisadores decidiram marcar a proteína radioativamente em um lote do vírus e o DNA em outro. Tudo que eles tinham de fazer era detectar a radioatividade para verificar se o DNA ou a proteína se encontravam dentro da bactéria. Para isso, Hershey e Chase incubaram seus vírus radiomarcados com *E. coli*; após esperar alguns minutos, para permitir a infecção, eles colocaram a mistura em um liquidificador. O liquidificador retirou as cabeças vazias dos vírus da superfície das células bacterianas. Os pesquisadores centrifugaram a amostra para separar as mais pesadas, bactérias infectadas que formaram um precipitado no fundo do tubo das partículas virais vazias, as quais permaneceram em suspensão (Figura 5-5B).

Como você já deve ter adivinhado, Hershy e Chase concluíram que o material radioativo era o DNA que entrava nas células bacterianas, enquanto as proteínas radioativas permaneciam nas cabeças dos vírus vazias. Eles também observaram que esse DNA marcado radioativamente também era incorporado à próxima geração de partículas virais.

Esse experimento demonstrou conclusivamente que o DNA viral entrava na célula hospedeira bacteriana, e as proteínas virais, não. Assim, o material genético desses vírus tinha de ser feito de DNA. Junto com os estudos realizados por Avery, MacLeod e McCarty, essas evidências concluíram o caso de que o DNA era o agente hereditário.

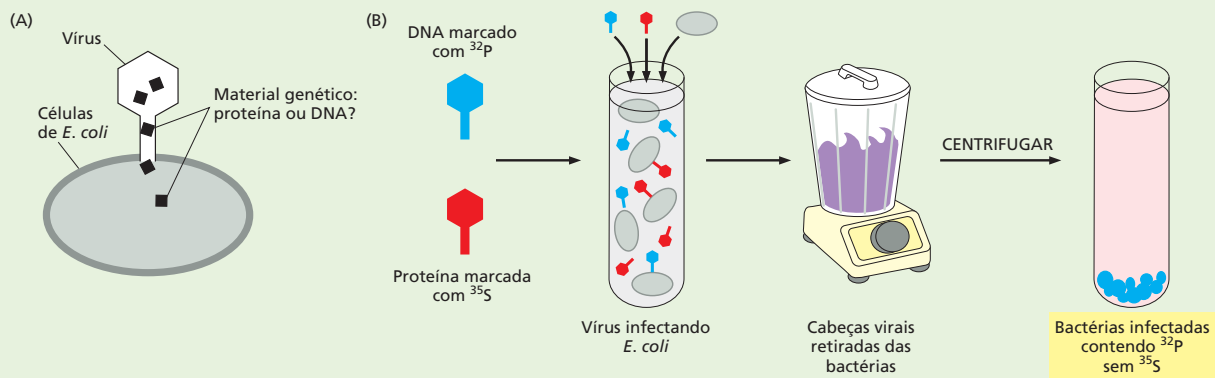
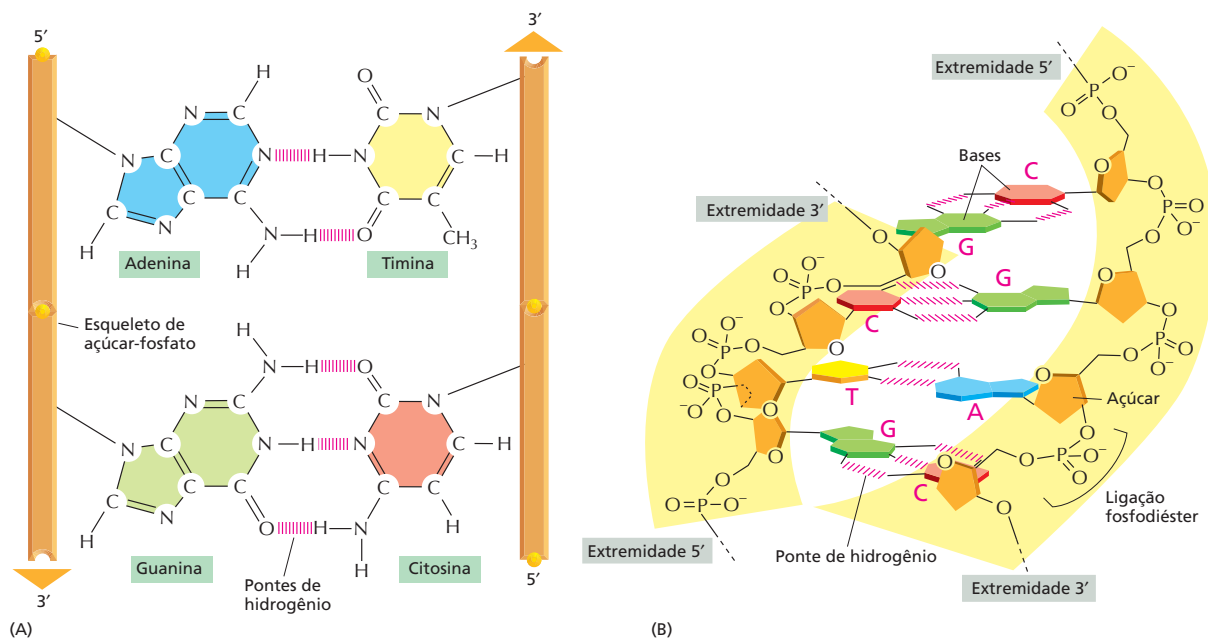



Figura 5-5 **Hershey e Chase demonstraram definitivamente que os genes são feitos de DNA.** (A) Os pesquisadores trabalharam com o vírus T2, o qual é constituído por proteína e DNA. Cada vírus atua como uma seringa molecular, injetando seu material genético na bactéria. A cápsula viral vazia permanece ligada ao exterior da célula bacteriana. (B) Para determinar se o material genético do vírus era proteína ou DNA, os pesquisadores marcaram radioativamente o DNA de um lote de vírus com ^{32}P e as proteínas de um segundo lote de vírus com ^{35}S. Como o DNA não possui enxofre e as proteínas não possuem fósforo, esses isótopos radioativos proporcionaram uma maneira fácil para que os pesquisadores distinguissem esses dois tipos de moléculas. Esses vírus marcados foram usados para infectar *E. coli*, e a mistura foi rompida brevemente em um liquidificador para separar a bactéria infectada das cápsulas virais vazias. Quando os pesquisadores mediram a radioatividade, eles encontraram que a maioria do DNA marcado com ^{32}P havia entrado nas células bacterianas, ao passo que a maioria das proteínas marcadas com ^{35}S permanecia em solução com o restante das partículas virais.

mais grupos fosfato e uma base contendo nitrogênio. Nos casos dos nucleotídeos no DNA, o açúcar é uma desoxirribose ligada a um único grupo fosfato (por isso, o nome ácido desoxirribonucleico), e a base pode ser *adenina* (*A*), *citosina* (*C*), *guanina* (*G*) ou *timina* (*T*). Os nucleotídeos são unidos covalentemente em uma cadeia por meio dos açúcares e fosfatos, os quais formam um "esqueleto" com açúcares e fosfatos alternados (ver Figura 5-2B). Cada cadeia polinucleotídica do DNA pode ser comparada com um colar contendo quatro tipos de contas diferentes (as quatro bases A, C, G e T), porque é somente a base que difere nas quatro subunidades nucleotídicas. Esses mesmos símbolos (A, C, G e T) são também usados para identificar os quatro nucleotídeos, isto é, com seu açúcar e seu fosfato.

A forma pela qual as subunidades nucleotídicas são unidas fornece à fita de DNA uma polaridade química. Se imaginarmos que cada nucleotídeo possui uma protuberância (o fosfato) e uma depressão (ver Figura 5-2A), cada cadeia completa formada pelo encaixe de protuberâncias e depressões terá todas as suas subunidades alinhadas e na mesma orientação. Além disso, as duas extremidades da cadeia são facilmente distinguíveis, pois uma possui a depressão (hidroxila 3′), e a outra, a protuberância (fosfato 5′). Essa polaridade da cadeia de DNA é indicada como extremidade 3′ e extremidade 5′. Essa convenção se baseia nos detalhes da ligação química entre as subunidades nucleotídicas.

As duas cadeias polinucleotídicas da **dupla-hélice** de DNA são unidas por pontes de hidrogênio entre as bases das diferentes fitas. Todas as bases estão, portanto, no interior da hélice com os açúcares de fosfatos voltados para o exterior (ver Figura 5-2D). As bases não pareiam ao acaso: A sempre pareia com T, e C sempre pareia com G (**Figura 5-6**). Em cada caso, uma base formada por dois anéis (uma purina, ver Painel 2-6, p. 74-75) pareia com uma base de um único anel (uma pirimidina). Esses pares purina-pirimidina são denominados **pares de bases**, e esta *complementaridade de pareamento de bases* permite que eles sejam compactados em um arranjo mais favorável energeticamente no interior da fita dupla. Nesse arranjo, cada par de

Figura 5-6 As duas fitas da dupla-hélice de DNA são unidas por pontes de hidrogênio entre os pares de bases complementares. (A) A forma e a estrutura química das bases permitem que a formação de pontes de hidrogênio seja eficiente somente entre A e T e entre C e G, onde os átomos que são capazes de formar pontes de hidrogênio (ver Painel 2-2, p. 66-67) podem aproximar-se sem perturbar a dupla-hélice. Duas pontes de hidrogênio se formam entre A e T e três entre C e G. As bases podem parear dessa forma apenas se as duas cadeias polinucleotídicas estiverem na posição antiparalela, isto é, orientadas em polaridades opostas. (B) Uma pequena seção da dupla-hélice vista lateralmente. São apresentados quatro pares de bases. Os nucleotídeos são ligados covalentemente por ligações fosfodiéster pelo grupo 3′-hidroxila (–OH) de um açúcar e o 5′-fosfato (–PO_4) do próximo. Essa ligação confere a polaridade química de cada fita polinucleotídica, isto é, as duas extremidades são quimicamente diferentes. A extremidade 3′ possui um grupo –OH livre ligado à posição 3′ do anel do açúcar. A extremidade 5′ possui um grupo fosfato livre ligado à posição 5′ do anel do açúcar.

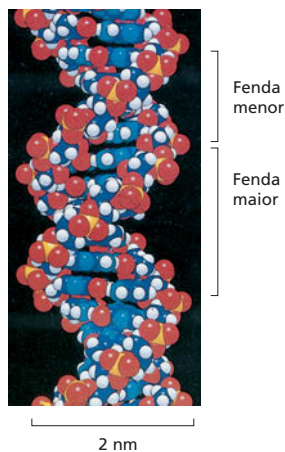



Figura 5-7 O modelo de preenchimento espacial apresenta a conformação da dupla-hélice de DNA. As duas fitas de DNA se enrolam uma ao redor da outra formando uma hélice que gira para a direita com 10 bases por volta. Na figura, está apresentada uma volta e meia de uma dupla-hélice de DNA. O enrolamento das duas fitas uma ao redor da outra cria duas fendas na dupla-hélice. A fenda mais larga é chamada de fenda maior, e a menor, de fenda menor. As cores dos átomos são: N = *azul*; O = *vermelho*; P = *amarelo* e H = *branco*.

bases tem largura similar, mantendo o esqueleto de fosfatos e açúcares em distâncias iguais ao longo da molécula de DNA. Os membros de cada par de bases podem encaixar perfeitamente na dupla-hélice porque as duas hélices são antiparalelas, isto é, elas são orientadas com as polaridades opostas (ver Figura 5-2C e D). Os dois esqueletos açúcar-fosfato antiparalelos torcem ao redor um do outro para formar uma dupla-hélice contendo 10 bases por volta (Figura 5-7). Essa torção também contribui para a conformação mais favorável energeticamente da dupla-hélice de DNA.

Uma consequência desses requisitos para o pareamento das bases é que cada molécula de DNA contenha uma sequência de nucleotídeos que é exatamente **complementar** à sequência nucleotídica da fita antiparalela. Um A sempre pareia com um T na fita oposta, e um C sempre pareia com um G na fita oposta. Essa complementaridade é de crucial importância para a cópia e o reparo do DNA, como será visto no Capítulo 6. Uma versão animada da estrutura do DNA pode ser vista na **Animação 5.1**.

A estrutura do DNA fornece um mecanismo para a hereditariedade

Os genes contêm a informação biológica que deve ser copiada e transmitida com precisão quando as células se dividem para formar duas células-filhas. Essa situação impõe dois problemas biológicos: como a informação genética para especificar um organismo pode estar contida em uma forma química e como ela pode ser copiada com precisão? A descoberta da estrutura da dupla-hélice de DNA foi um marco na biologia do século XX porque permitiu respostas imediatas a essas duas questões e, portanto, resolveu, em nível molecular, os problemas de hereditariedade. Neste capítulo, salientaremos a resposta à primeira questão, e no próximo capítulo veremos em detalhes a resposta da segunda questão.

O DNA codifica a informação na ordem ou sequência de nucleotídeos ao longo de cada fita. Cada base – A, C, T ou G – pode ser considerada como uma letra em um alfabeto de quatro letras que é usado para escrever as mensagens biológicas na estrutura química do DNA (Figura 5-8). Os organismos diferem uns dos outros porque as suas respectivas moléculas de DNA possuem diferentes *sequências nucleotídicas* e, consequentemente, diferentes mensagens biológicas. Como o alfabeto de nucleotídeos é usado para construir as mensagens e como ela é escrita?

Já foi estabelecido, mesmo antes da determinação da estrutura do DNA, que os genes contêm as instruções para a produção de proteínas. As mensagens no DNA, portanto, devem de alguma forma, codificar proteínas. Considerando o caráter químico das proteínas, o problema fica mais fácil de ser definido. Como discutido no Capítulo 4, a função de uma proteína é determinada por sua estrutura tridimensional, e sua estrutura, por sua vez, é determinada pela sequência de aminoácidos de sua cadeia polipeptídica. A sequência linear de nucleotídeos em um gene deve, portanto, de alguma forma, ditar a sequência de aminoácidos da proteína.

A correspondência exata entre o alfabeto de quatro letras de nucleotídeos do DNA e das 20 letras do alfabeto de aminoácidos das proteínas – o *código genético* – não é óbvia a partir da estrutura da molécula de DNA, e levou mais de uma década após a descoberta da fita dupla para que o mesmo fosse estabelecido. No Capítulo 7, descrevemos esse código em detalhes no processo conhecido como *expressão gênica*, pelo qual uma célula *transcreve* a sequência de nucleotídeos de um gene em uma molécula de RNA e então *traduz* essa informação na sequência de aminoácidos de uma proteína (Figura 5-9).

A série completa de informações no DNA de um organismo é denominada **genoma** (o termo é também usado para se referir ao DNA que carrega essa informação). A quantidade total dessa informação é surpreendente: a sequência de nucleotídeos de um gene humano pequeno, escrita com o alfabeto de nucleotídeos de quatro letras, ocupa um quarto de uma página de texto, enquanto

QUESTÃO 5-1

Qual das seguintes afirmativas está correta? Explique sua resposta.

A. Uma fita de DNA possui polaridade porque uma das extremidades da fita é mais carregada do que a outra.
B. Os pares de bases G-C são mais estáveis do que os pares de bases A-T.

a sequência completa do genoma humano preenche mais de 1.000 livros do tamanho deste. Aqui reside um problema que afeta a arquitetura de todos os cromossomos eucarióticos: como toda essa informação pode ser compactada habilmente em cada núcleo celular? No restante deste capítulo, discutiremos as respostas a essas questões.

(A) Biologia molecular é...

(B)

(C) •▬ •▬•• •• ▬•▬• •

(D) 细胞生物学乐趣无穷

(E) TTCGAGCGACCTAACCTATAG

Figura 5-8 Mensagens lineares são apresentadas de diferentes formas. As linguagens aqui apresentadas são: (A) português, (B) escala musical (C) código Morse, (D) chinês e (E) DNA.

A ESTRUTURA DOS CROMOSSOMOS EUCARIÓTICOS

Grandes quantidades de DNA são necessárias para codificar toda a informação necessária para fazer uma bactéria de célula única, e muito mais DNA é necessário para codificar as instruções para o desenvolvimento de organismos multicelulares como o nosso. Cada célula humana contém cerca de 2 m de DNA, e o núcleo celular tem somente 5-8 μm de diâmetro. Dobrar todo esse material em um espaço tão pequeno é o equivalente a tentar dobrar 40 km de um fio extremamente fino em uma bola de tênis.

Nas células eucarióticas, enormes moléculas de DNA de fita dupla são empacotadas em **cromossomos**, que não apenas se encaixam facilmente no núcleo, mas podem também ser facilmente divididos entre as duas células-filhas a cada divisão celular. Como veremos nesta seção, o complexo empacotamento do DNA é realizado por proteínas especializadas que se ligam e dobram o DNA, produzindo uma série de cordões e alças que permitem altos níveis organizacionais e que impedem que o DNA se torne emaranhado. Surpreendentemente, o DNA é compactado de uma forma ordenada e que pode tornar-se acessível a todas as enzimas e outras proteínas para sua replicação, reparo e expressão de seus genes.

As bactérias tipicamente possuem seus genes em uma única molécula de DNA circular. Esse DNA é também associado a proteínas que condensam o DNA, mas difere das proteínas que empacotam o DNA eucariótico. Embora seja frequentemente denominado "cromossomo" bacteriano, esse DNA procariótico não apresenta a mesma estrutura do que o DNA dos cromossomos eucarióticos, e pouco se sabe a respeito de sua compactação. Nossa discussão a respeito da estrutura dos cromossomos neste capítulo será exclusivamente em relação ao cromossomo eucariótico.

O DNA de eucarioto é empacotado em múltiplos cromossomos

Nos eucariotos, como nós, o DNA do núcleo está distribuído em um grupo de diferentes cromossomos. O genoma humano, por exemplo, contém aproximadamente $3{,}2 \times 10^9$ nucleotídeos distribuídos em 24 cromossomos. Cada cromossomo consiste em uma única e enorme molécula de DNA linear associada a proteínas que compactam e dobram o fino cordão de DNA em uma estrutura mais compacta. O complexo de DNA e proteínas é denominado *cromatina*. Além das proteínas envolvidas na compactação do DNA, os cromossomos estão associados a outras proteínas envolvidas na expressão gênica, na replicação do DNA e no reparo do DNA.

Com exceção das células germinativas (espermatozoides e óvulos) e das células altamente especializadas que não possuem DNA (como os eritrócitos), cada célula humana contém duas cópias de cada cromossomo, uma herdade da mãe e a outra herdada do pai. Os cromossomos maternos e paternos de um par são denominados *cromossomos homólogos*. O único par de cromossomos não homólogos são os cromossomos sexuais nos machos, onde o *cromossomo Y* é herdado do pai e um *cromossomo X* é herdado da mãe.

Além de serem de diferentes tamanhos, os cromossomos humanos podem ser distinguidos uns dos outros por meio de várias técnicas. Cada cromossomo pode ser "pintado" com cores diferentes usando-se moléculas de DNA ligadas a corantes fluorescentes distintos (**Figura 5-10**) por meio da téc-

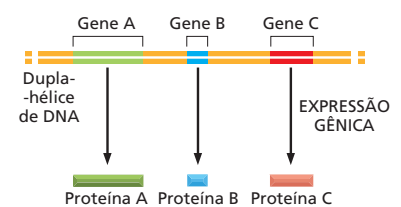



Figura 5-9 Os genes contêm a informação para a produção de proteínas. Como veremos no Capítulo 7, cada gene que codifica uma proteína é usado para produzir moléculas de RNA que então coordenam a produção de moléculas proteicas específicas. O RNA intermediário não está representado nesse diagrama.

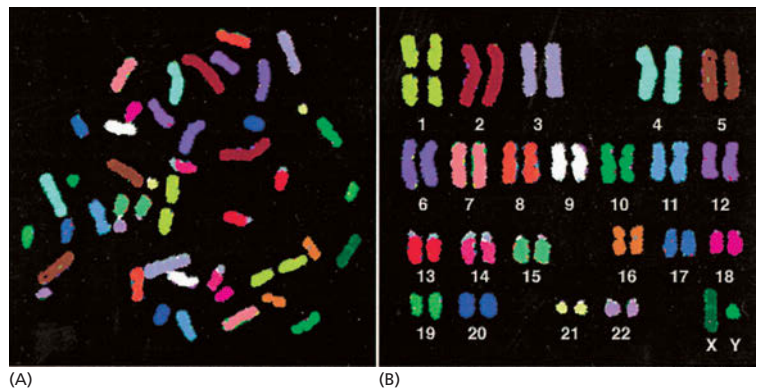
Figura 5-10 Cada cromossomo humano pode ser "pintado" com uma cor diferente para permitir a identificação precisa sob microscópio de luz direta. Os cromossomos de um indivíduo do sexo masculino foram isolados de uma célula em divisão (mitose) e, portanto, em um estado altamente compactado. A coloração dos cromossomos é realizada pela exposição a uma série de moléculas de DNA humano que foram ligadas a uma combinação de corantes fluorescentes. Por exemplo, moléculas de DNA do cromossomo 1 são marcadas com uma combinação específica de corantes, aquelas do cromossomo 2 com outra combinação, e assim por diante. Como o DNA marcado pode formar pares de bases, ou hibridizar, somente com seu cromossomo de origem (discutido no Capítulo 10), cada cromossomo é diferentemente marcado. Para tais experimentos, os cromossomos estão sujeitos a tratamentos que separam a dupla-hélice de DNA em fitas individuais para permitir o pareamento de bases com o DNA de fita simples marcado, mantendo a estrutura do cromossomo relativamente intacta. (A) Cromossomos visualizados como estão nas células lisadas. (B) Os mesmos cromossomos artificialmente alinhados em ordem. Neste *cariótipo*, os cromossomos homólogos são numerados e organizados em pares. A presença do cromossomo Y indica que o DNA foi isolado de um indivíduo do sexo masculino. (De E. Schröck *et al.*, *Science* 273:494-497, 1996. Com permissão da AAAS.)

nica de *hibridização de DNA* que será descrita em detalhes no Capítulo 10. A maneira mais tradicional de distinguir um cromossomo do outro é corar os cromossomos com corantes que se ligam a certos tipos de sequências de DNA. Esses corantes distinguem principalmente DNA rico em pares de nucleotídeos A-T e DNA rico em G-C, produzindo um padrão confiável de bandas ao longo de cada cromossomo (**Figura 5-11**). O padrão de bandas de cada tipo de cromossomo é único, permitindo que cada cromossomo seja identificado e numerado.

Figura 5-11 Padrão de bandeamento característico permite a identificação de cada cromossomo humano. Os cromossomos de 1 a 22 são numerados aproximadamente em ordem de tamanho. Uma típica célula somática humana (isto é, célula não germinativa) contém dois de cada um desses cromossomos mais dois cromossomos sexuais, dois cromossomos X no caso das fêmeas e um cromossomo X e um Y no caso dos machos. Os cromossomos usados para fazer esse mapeamento foram corados no início da mitose, quando o DNA está compactado, mas não tão compactado como estaria mais adiante nesse processo. A linha *vermelha* horizontal representa a posição do centrômero, o qual aparece como uma constrição nos cromossomos mitóticos. Os apêndices (*vermelho*) nos cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22 indicam a posição dos genes que codificam para os grandes RNAs ribossomais (discutido no Capítulo 7). Esses padrões são obtidos pela coloração dos cromossomos com Giemsa, um corante que produz bandas escuras nas regiões ricas em pares de nucleotídeos A-T. (Adaptada de U. Franke, *Cytogenet. Cell Genet.* 31:24- 32,1981. Com permissão de S. Karger AG.)

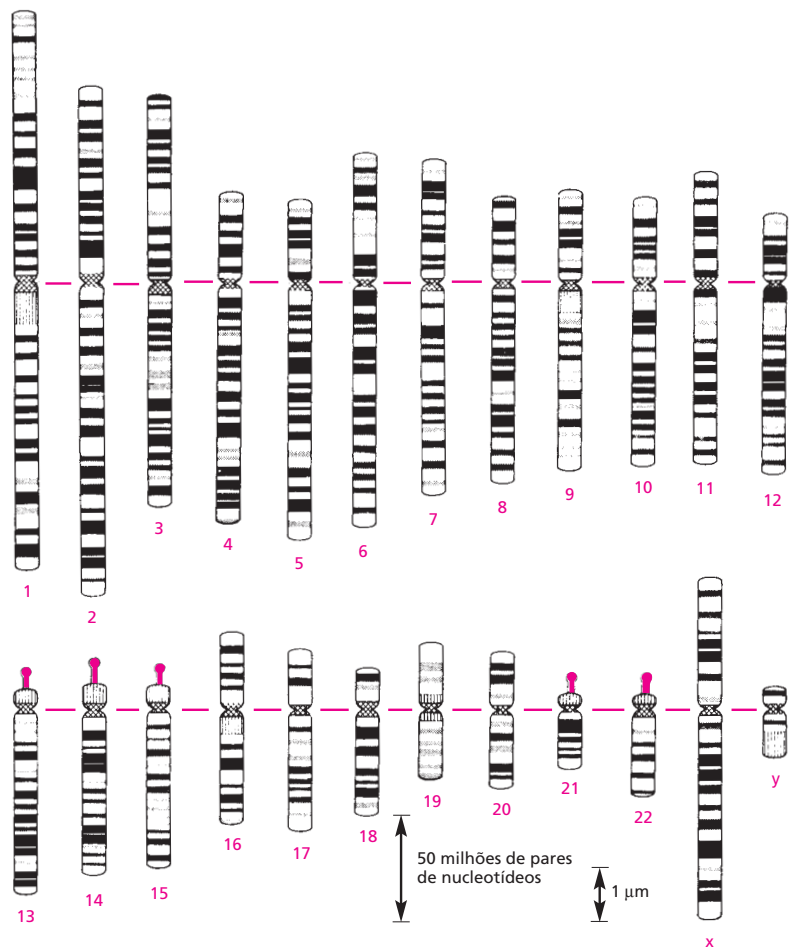
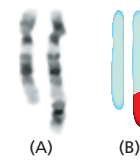



Figura 5-12 Cromossomos anormais estão associados a algum defeito genético hereditário. (A) Um par de cromossomos 12 de um paciente com ataxia hereditária, uma doença caracterizada pela deterioração progressiva do sistema motor. O paciente tem um cromossomo 12 normal *(esquerda)* e um cromossomo 12 anormal, muito mais longo. O material adicional presente no cromossomo 12 alterado foi determinado, de seu padrão de bandas, como um pedaço do cromossomo 4 que se ligou de forma inapropriada ao cromossomo 12. (B) Neste diagrama, os cromossomos de (A) possuem o segmento correspondente ao DNA do cromossomo 4 "pintado" de *vermelho*, e o segmento correspondente ao cromossomo 12 em *azul*. (De E. Schröck *et al. Science* 273:494- 497,1996. Com permissão de AAAS.)

A apresentação de uma série completa dos 46 cromossomos humanos é denominada **cariótipo** humano. Se parte de um cromossomo é perdida ou trocada entre cromossomos, essas mudanças podem ser detectadas por mudanças nos padrões de bandeamento. Os citogeneticistas usam as alterações no padrão de bandeamento para detectar anormalidades cromossômicas que estão associadas com alguns defeitos hereditários (**Figura 5-12**) e com determinados tipos de câncer.

QUESTÃO 5-2

Na dupla-hélice de DNA, os nucleotídeos adjacentes estão 0,34 nm de distância. Use a Figura 5-11 para estimar a extensão do DNA do cromossomo 1 humano se ele estivesse esticado. Se o tamanho do cromossomo 1 na mitose é de 10 μm, qual é o grau de compactação do DNA nesse estágio?

Os cromossomos contêm longas cadeias de genes

A função mais importante dos cromossomos é a de portar os genes, a unidade funcional da hereditariedade (**Figura 5-13**). Um **gene** é, normalmente, definido como um segmento de DNA que contém as instruções para produzir uma determinada proteína (ou, em alguns casos, uma série de proteínas relacionadas). Embora essa definição seja adequada à maioria dos genes, alguns genes controlam a produção de moléculas de RNA, em vez de proteínas como seu produto final. Como as proteínas, as moléculas de RNA desempenham uma série distinta de funções catalíticas e estruturais na célula, como veremos nos últimos capítulos.

Como esperado, existe uma correlação entre a complexidade de um organismo e o número de genes em seu genoma. Por exemplo, o número total de genes varia entre menos de 500 em uma simples bactéria a cerca de 25.000 no homem. Bactérias e alguns eucariotos unicelulares possuem genoma especialmente compacto. As moléculas de DNA que compõem seus cromossomos são um pouco mais de um cordão de genes compactados muito próximos. Entretanto, os cromossomos de muitos eucariotos (incluindo humanos) contêm, além dos genes, um grande excesso de DNA intercalado que parece não portar nenhuma informação fundamental. Esse DNA é, algumas vezes, considerado "lixo de DNA", pois sua utilidade para a célula ainda não foi claramente demonstrada. Embora a sequência de nucleotídeo desse DNA possa não ser importante, o próprio DNA atuando como material espaçador pode ser crucial para a evolução a longo prazo de espécies e para a atividade adequada dos genes. Além disso, comparações entre as sequências genômicas de muitas espécies diferentes mostrou que parte desse DNA extra é altamente conservado entre espécies relacionadas, indicando que ele desempenha funções importantes, embora ainda não saibamos quais. Discutiremos isso detalhadamente no Capítulo 9.

Em geral, quanto mais complexo é um organismo, maior é seu genoma, mas esse relacionamento nem sempre é verdadeiro. O genoma humano, por exemplo, é 200 vezes maior do que o da levedura *S. cerevisiae*, mas 30 vezes menor do que algumas plantas e pelo menos 60 vezes menor do que algumas

Figura 5-13 Os genes estão organizados ao longo dos cromossomos. Esta figura mostra um pequeno segmento de um cromossomo da levedura *S. cerevisae*. O genoma de *S. cerevisae* contém cerca de 6.300 genes, mais de 12 milhões de pares de nucleotídeos dispersos em 16 cromossomos. Observe que, em cada gene, somente uma das duas fitas de DNA realmente codifica a informação para a produção de uma molécula de RNA ou proteína, e isso pode ocorrer em qualquer uma das fitas, como indicado pelas barras em *vermelho-claro*. Entretanto, os genes são geralmente representados nas duas fitas como complementares, como na Figura 5-9. A alta densidade de genes é característica dessas espécies.

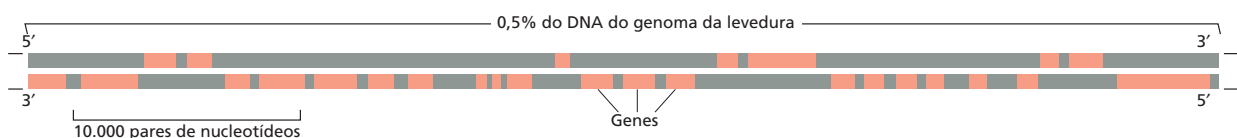
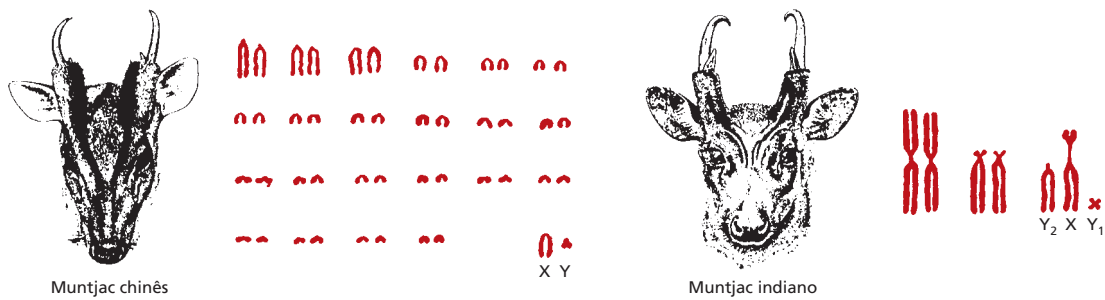



Figura 5-14 Espécies relacionadas podem apresentar números cromossômico bem diferentes. Durante a evolução do cervo indiano muntjac, os cromossomos que eram separados inicialmente se fundiram sem causar efeitos graves nos animais. Essas duas espécies possuem aproximadamente o mesmo número de genes. (De B.K. Hall e B.Hallgrimsson, Strickberger´s Evolution, 4. ed. Sudbury, MA, 2008. Com permissão de Jones & Bartlett Publishers.)

espécies de ameba. Além disso, como o DNA é dividido entre os cromossomos, também varia de uma espécie para outra. O homem possui 46 cromossomos, mas uma espécie de veado pequeno possui somente 6, ao passo que certas espécies de carpa possuem mais de 100. Espécies muito relacionadas com genomas de tamanho similar podem apresentar cromossomos que diferem em número e tamanho (Figura 5-14). Assim, embora o número de genes esteja grosseiramente relacionado com a complexidade da espécie, não há um relacionamento simples entre o número de genes, o número de cromossomos e o tamanho total do genoma. O genoma e os cromossomos das espécies modernas foram moldados por uma história exclusiva de eventos genéticos aparentemente aleatórios onde atuou a pressão seletiva.

Os cromossomos existem em diferentes formas durante a vida da célula

Para formar um cromossomo funcional, uma molécula de DNA deve fazer mais do que simplesmente portar os genes; ela deve ser capaz de replicar, e as cópias replicadas devem ser separadas e divididas igualmente entre as células-filhas a cada divisão celular. Esses processos ocorrem por meio de uma série ordenada de eventos, conhecida como **ciclo celular**. Esse ciclo do crescimento e da divisão celular está resumido na Figura 5-15 e será discutido em detalhes no Capítulo 18. Somente dois desses estágios serão abordados neste capítulo: a *interfase*, quando os cromossomos são duplicados, e a *mitose*, quando eles são distribuídos para as duas células-filhas.

Durante a interfase, os cromossomos estão distendidos como longas e finas fitas emaranhadas de DNA no núcleo e não podem ser facilmente visualizados ao microscópio. Referimos-nos aos cromossomos nessa forma relaxada como *cromossomos interfásicos*. Sequências de DNA especializadas, encontradas em todas as células de eucariotos, asseguram que os cromossomos interfásicos repliquem eficientemente (Figura 5-16). Um tipo de sequência nucleotídica

Figura 5-15 A replicação e a segregação dos cromossomos ocorrem de maneira ordenada durante o ciclo celular das células em proliferação. Durante a interfase, a célula está expressando seus genes ativamente. Durante a interfase, o DNA é replicado, e os cromossomos são duplicados. Uma vez terminada a replicação do DNA, a célula pode entrar na *fase M*, quando ocorre a mitose. A mitose é a divisão do núcleo. Durante esse estágio, os cromossomos condensam, a expressão gênica cessa, o envelope nuclear é degradado, e o fuso mitótico é formado pelos microtúbulos e por outras proteínas. Os cromossomos condensados são capturados pelo fuso mitótico, e uma série completa de cromossomos é puxada para os polos opostos da célula. O envelope nuclear se forma ao redor de cada grupo de cromossomos, e, no passo final da fase M, a célula se divide para formar duas células-filhas. Para simplificar, mostramos aqui apenas dois cromossomos.

Figura 5-16 Três elementos das sequências de DNA são necessários para produzir um cromossomo eucariótico que pode ser replicado e então segregado durante a mitose. Cada cromossomo possui múltiplas origens de replicação, um centrômero e dois telômeros. No desenho esquemático, estão descritas as sequências de eventos que um cromossomo típico sofre durante o ciclo celular. O DNA replica na interfase, iniciando na origem de replicação e seguindo bidirecionalmente da origem por todo o cromossomo. Na fase M, o centrômero dos cromossomos duplicados é ligado ao fuso mitótico de modo que uma cópia de cada cromossomo é distribuída para cada célula-filha após a divisão celular. O centrômero também auxilia a manter os cromossomos duplicados juntos até que estejam prontos para serem separados. Os telômeros formam proteções especiais nas extremidades de cada cromossomo.

atua como **origem de replicação**, local em que a duplicação do DNA tem início, como discutido no Capítulo 6. Os cromossomos eucariotos contêm muitas origens de replicação para assegurar que o cromossomo inteiro possa ser replicado rapidamente. Outra sequência de DNA forma os **telômeros**, encontrados em cada uma das extremidades dos cromossomos. Os telômeros contêm sequências nucleotídicas repetidas que permite que as extremidades dos cromossomos sejam replicadas, como será discutido no Capítulo 6. Eles também protegem as extremidades dos cromossomos, impedindo que sejam confundidos pelas células como moléculas de DNA quebradas necessitando de reparo.

Quando o ciclo celular atinge a fase M, o DNA se torce, adquirindo uma estrutura mais compacta, até que sua estrutura mais altamente condensada, que é o *cromossomo mitótico*, tenha sido formada. Essa é a forma na qual os cromossomos são mais facilmente visualizados. Nesse estado altamente condensado, os cromossomos duplicados podem ser facilmente separados quando a célula se divide (ver Figura 5-16). Uma vez que o cromossomo está condensado, é a presença de uma terceira sequência de DNA especializada, o **centrômero**, que permite que uma cópia de cada cromossomo duplicado seja dividida para cada célula-filha (**Figura 5-17**). Descreveremos o papel central dos telômeros na divisão celular no Capítulo 18.

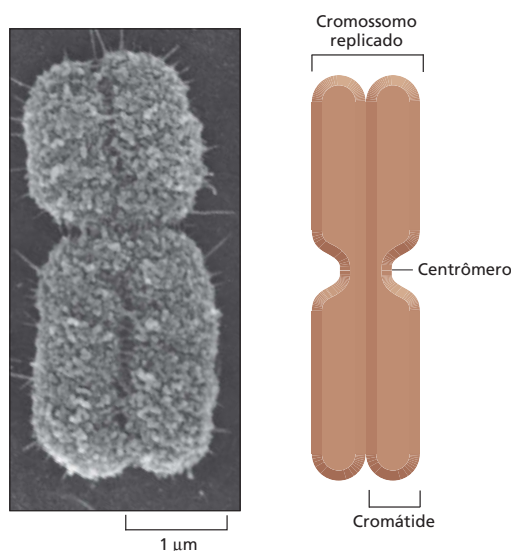
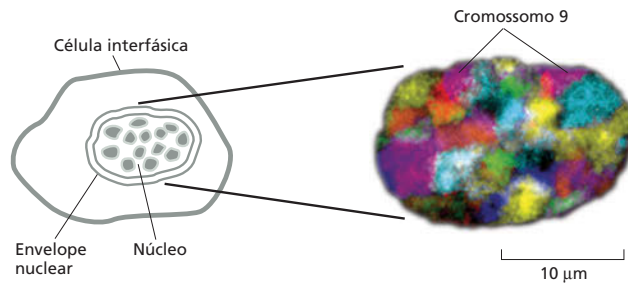



Figura 5-17 Típico cromossomo mitótico altamente compactado. Cada cromossomo mitótico contém duas moléculas de DNA idênticas porque são replicados durante a interfase (ver Figura 5-16). Cada uma dessas longas moléculas de DNA, juntamente com suas proteínas associadas, são denominadas *cromátide*. (A) Micrografia eletrônica de varredura de um cromossomo mitótico. As duas cromátides estão fortemente unidas. A região de constrição indica a posição do centrômero. (B) Desenho esquemático do cromossomo mitótico. (A, cortesia de Terry D. Allen.)

Figura 5-18 Os cromossomos interfásicos ocupam diferentes regiões no núcleo. Sondas de DNA ligadas a diferentes marcadores fluorescentes são usados para pintar cromossomos interfásicos específicos em uma célula humana. Quando observado sob microscópio de fluorescência, cada cromossomo interfásico se localiza em territórios distintos dentro do núcleo, em vez de estarem misturados com outros cromossomos como um espaguete em uma tigela. Observe que os pares de cromossomos homólogos presentes em uma célula diploide (p. ex., as duas cópias do cromossomo 9 indicadas) geralmente não estão na mesma posição (De M.R. Speicher e N.P. Carter, *Nat. Rev. Genet.* 6:782-792, 2005. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Os cromossomos interfásicos estão organizados no interior do núcleo

O núcleo é circundado por um *envelope nuclear* formado por duas membranas concêntricas. O envelope nuclear é perfurado em intervalos por poros nucleares, os quais transportam ativamente moléculas do citosol para o núcleo e do núcleo para o citosol (descrito em detalhes no Capítulo 15) e sustentado pela *lâmina nuclear*, uma rede de filamentos de proteínas que forma uma fina camada forrando a membrana nuclear interna (discutido no Capítulo 17)

No interior do núcleo, os cromossomos interfásicos, embora mais longos e finos que os cromossomos mitóticos, estão organizados de várias formas. Cada cromossomo interfásico tende a ocupar uma determinada região no núcleo de maneira que os diferentes cromossomos não enrosquem uns com os outros (Figura 5-18). Além disso, regiões cromossômicas específicas se ligam a regiões do envelope nuclear ou da lâmina nuclear.

O exemplo mais óbvio de organização cromossômica no núcleo interfásico é o **nucléolo** (Figura 5-19). O nucléolo é uma região onde partes de diferentes cromossomos portando genes para o RNA ribossomal se agrupam (pontos vermelhos na Figuras 5-11). Aqui, os RNAs ribossomais são sintetizados e combinados com proteínas para formar os ribossomos, a maquinaria de síntese proteica das células (discutida no Capítulo 7).

O DNA nos cromossomos é muito condensado

Como vimos, todas as células eucarióticas, seja em interfase, seja em mitose, compactam seu DNA em cromossomos. O cromossomo humano 22, por exemplo, contém cerca de 48 milhões de pares de nucleotídeos, e, se estendidos de ponta à ponta, seu DNA deve ter cerca de 1,5 cm. Mesmo assim, durante a

Figura 5-19 O nucléolo é a estrutura mais evidente no núcleo interfásico. Micrografia eletrônica de uma fina secção através do núcleo de um fibroblasto humano. O núcleo é circundado por uma membrana dupla denominada envelope nuclear. Dentro do núcleo, a cromatina aparece como uma mancha difusa, com regiões cromossômicas especialmente densas, denominada heterocromatina (regiões escuras). A heterocromatina é pobre em genes e está localizada, principalmente, na periferia, imediatamente abaixo do envelope nuclear. As grandes regiões escuras são os nucléolos que contêm os genes para os RNAs ribossômicos, os quais estão localizados em vários cromossomos que se agrupam no nucléolo. (Cortesia de E.G. Jordan e J. McGovern.)

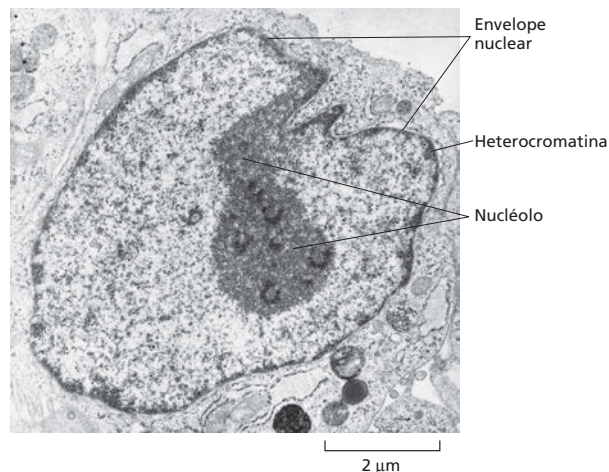



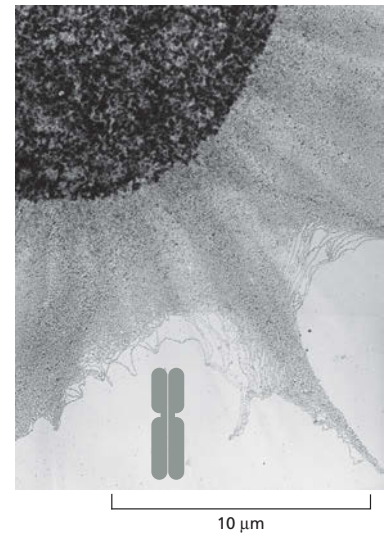
Figura 5-20 O DNA dos cromossomos interfásicos são menos compactos que os cromossomos mitóticos. Micrografia eletrônica mostrando um grande emaranhado de DNA cromossômico (que está associado a proteínas) saindo do núcleo interfásico lisado. Um desenho esquemático de um cromossomo mitótico humano condensado é apresentado na mesma escala para comparação. (Cortesia de Victoria Foe.)

mitose, o cromossomo 22 mede somente cerca de 2 μm em extensão, o que é aproximadamente 10.000 vezes mais compacto do que em sua forma estendida. Essa característica marcante de compressão é realizada por proteínas que torcem e dobram o DNA em níveis cada vez mais altos de organização. O DNA dos cromossomos interfásicos, embora menos condensado do que o cromossomo mitótico (Figura 5-20), é ainda grandemente compactado com uma taxa de compressão de cerca de 500 vezes.

Nas próximas seções, apresentaremos as proteínas especializadas que tornam possível essa compressão. Deve-se ter em mente que os cromossomos são uma estrutura dinâmica. Não apenas os cromossomos condensam e relaxam, de acordo com o ciclo celular, mas diferentes regiões do cromossomo interfásico devem relaxar para permitir o acesso a diferentes sequências do DNA para a replicação, o reparo ou a expressão gênica. A compactação dos cromossomos deve, portanto, ser flexível o suficiente para permitir o acesso rápido e localizado ao DNA, quando necessário.

Os nucleossomos são as unidades básicas da estrutura do cromossomo eucariótico

As proteínas que se ligam ao DNA para formar os cromossomos eucarióticos são tradicionalmente divididas em duas classes gerais: as **histonas** e as proteínas cromossômicas não histonas. As histonas estão presentes em enormes quantidades (mais de 60 milhões de moléculas de diferentes tipos em cada célula), e sua massa total nos cromossomos é quase igual à do próprio DNA. O complexo das duas classes de proteínas com o DNA nuclear é denominado **cromatina**.

As histonas são responsáveis pelo primeiro nível fundamental de compactação à cromatina, o **nucleossomo**, o qual foi descoberto em 1974. Quando o núcleo em interfase é quebrado com cuidado e seu conteúdo examinado sob microscópio eletrônico, a maioria da cromatina está na forma de fibra com um diâmetro de cerca de 30 nm (Figura 5-21A). Se essa cromatina é sujeita a tratamentos que a descompacte parcialmente, ela então pode ser vista ao microscópio eletrônico como um "colar de contas" (Figura 5-21B). O cordão é o DNA, e as pérolas são as *partículas do cerne do nucleossomo* que consiste no DNA enrolado em um núcleo de proteínas formado pelas histonas.

QUESTÃO 5-3

Assumindo que um octâmero de histonas forme um cilindro de 9 nm de diâmetro e 5 nm de comprimento e que o genoma humano forma 32 milhões de nucleossomos, que volume nuclear (6 μm de diâmetro) seria ocupado pelos octâmeros de histonas? (O volume de um cilindro é $\pi r^2 h$; o volume de uma esfera é $4/3\ \pi r^3$.). Que fração do volume nuclear total é ocupada pelos octâmeros de histonas? Como isso se compara ao volume do núcleo ocupado pelo DNA humano?

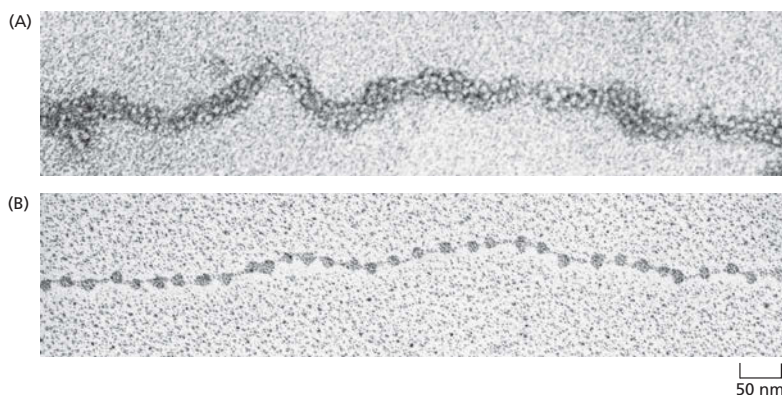



Figura 5-21 Os nucleossomos podem ser visualizados por microscopia eletrônica. (A) A cromatina isolada diretamente de um núcleo interfásico aparece ao microscópio eletrônico como um cordão de 30 nm de espessura, e aqui é mostrado parte dessa fibra. (B) Essa micrografia eletrônica mostra a cromatina que foi descompactada experimentalmente, ou descondensada, após o isolamento, para mostrar os nucleossomos. (A, cortesia de Barbara Hamkalo; B, cortesia de Victoria Foe.)

Figura 5-22 Os nucleossomos contêm o DNA enrolado ao redor de um cerne de proteínas contendo oito moléculas de histonas. Em um tubo de ensaio, a partícula do cerne do nucleossomo pode ser liberada da cromatina pela digestão do DNA de ligação com uma nuclease, uma enzima que quebra o DNA. (A nuclease pode degradar o DNA exposto, mas não pode danificar o DNA que está fortemente enrolado ao redor do cerne do nucleossomo.) Após a dissociação dos nucleossomos isolados em seu cerne de proteínas e DNA, pode-se determinar o tamanho do DNA que estava ao redor do cerne. Sua extensão de 147 pares de nucleotídeos é suficiente para enrolar o cerne de histonas por duas vezes.

A estrutura da partícula central do nucleossomo foi determinada após o primeiro isolamento do nucleossomo da cromatina descompactada pela digestão com determinadas enzimas (denominadas nucleases) que quebram o DNA cortando-o entre os nucleotídeos. Após a digestão por um curto período de tempo, o DNA exposto entre as partículas do cerne do nucleossomo, o *DNA de ligação*, é degradado. Uma partícula do cerne do nucleossomo consiste em um complexo de oito proteínas histonas – duas moléculas de cada histona H2A, H2B, H3 e H4 – e uma fita dupla de DNA com cerca de 147 pares de nucleotídeos que circundam esse *octâmero de histonas* (**Figura 5-22**). A estrutura de alta resolução da partícula do cerne do nucleossomo foi determinada em 1997, revelando os detalhes atômicos do complexo de histonas em forma de disco ao redor do qual o DNA está firmemente preso fazendo 1,7 volta em uma hélice para a esquerda (**Figura 5-23**).

O DNA de ligação entre cada partícula do cerne do nucleossomo pode variar em comprimento de poucos pares de nucleotídeos até cerca de 80. (O termo nucleossomo se refere tecnicamente a uma partícula do cerne mais o DNA de ligação adjacente (ver Figura 5-22), mas é frequentemente utilizado para significar apenas a partícula do cerne do nucleossomo.) A formação dos nucleossomos converte uma molécula de DNA em uma fita de cromatina de aproximadamente um terço de sua extensão inicial e confere o primeiro nível de compactação do DNA.

Todas as quatro histonas que formam o cerne do nucleossomo são proteínas relativamente pequenas com uma alta proporção de aminoácidos positivamente carregados (lisina e arginina). As cargas positivas auxiliam as histonas a ligarem-se fortemente ao esqueleto de fosfato e açúcares negativamente carregados do DNA. Essas numerosas interações explicam em parte por que o DNA de praticamente qualquer sequência pode ligar-se ao cerne de histonas. Cada cerne de histonas possui uma longa "cauda" N-terminal, a qual se estende para fora da partícula do cerne do nucleossomo (ver Figura 5-23). Essas caudas de histonas estão sujeitas a vários tipos de modificações químicas covalentes que controlam muitos aspectos da estrutura da cromatina.

Figura 5-23 A estrutura da partícula do cerne do nucleossomo, como determinado pela análise de difração de raios X, revela como o DNA está fortemente enrolado ao redor de um cerne de histonas em forma de disco. Aqui estão apresentadas duas posições da estrutura do nucleossomo. A hélice de DNA é *cinza*. A porção da cauda da histona H3 (*verde*) pode ser vista como uma extensão do nucleossomo, mas as caudas das outras histonas estão encurtadas. (Reimpresso com permissão de K. Luger *et al.*, *Nature* 389:251-260, 1997. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

As histonas que formam o cerne do nucleossomo estão entre as mais conservadas de todas as proteínas de eucariotos conhecidas. Há somente duas diferenças entre as sequências de aminoácidos na histona H4 da ervilha e de bovinos, por exemplo. Essa extrema conservação evolutiva reflete o papel estrutural vital das histonas no controle da estrutura do cromossomo eucariótico. Recentemente, as histonas também foram encontradas em Archaea – procariotos que formam um reino filogenético distinto dos Eukarya e Bacteria (discutidos no Capítulo 1).

O empacotamento dos cromossomos ocorre em multiplos níveis

Embora sejam formadas longas fitas de nucleossomos na maioria do DNA cromossomal, a cromatina nas células vivas raramente adota a forma estendida de colar de contas, como mostra a Figura 5-21B. Em vez disso, os nucleossomos são compactados ainda mais para gerar uma estrutura mais compacta de *fibras de 30 nm* (ver Figura 5-21A). O empacotamento dos nucleossomos em fibras de 30 nm depende de uma quinta histona denominada histona H1, a qual mantém os nucleossomos unidos em um arranjo repetido regular. Essa histona "ligadora" altera a direção do DNA quando sai do cerne do nucleossomo, permitindo que se forme uma estrutura mais compacta (**Figura 5-24**). A fibra de 30 nm resultante está ilustrada na **Animação 5.2** e na **Figura 5-25**, como parte de um desenho esquemático dos vários níveis de compactação dos cromossomos.

Sabemos que a fibra de cromatina de 30 nm pode ser compactada ainda mais. Vimos, neste capítulo, que durante a mitose a cromatina se torna tão altamente condensada que os cromossomos podem ser vistos sob microscópio de luz direta. Como a fibra de 30 nm é dobrada para produzir os cromossomos mitóticos? A resposta a essa questão ainda não é conhecida em detalhes, mas

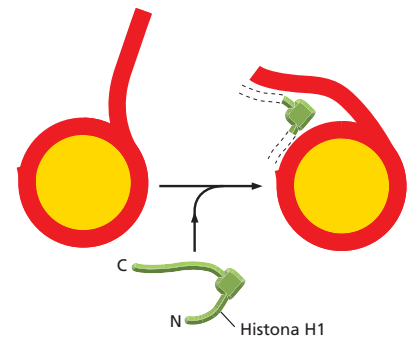



Figura 5-24 Uma histona de ligação auxilia a manter os nucleossomos unidos em uma fibra de 30 nm. A histona H1 é formada por uma região globular e um par de longas caudas na sua porção C e N-terminal. A região globular contém 20 pares de bases adicionais de DNA no local que sai do cerne do nucleossomo, uma atividade que se acredita ser importante para a formação da fibra de 30 nm. A longa cauda C terminal é necessária para que a H1 se ligue à cromatina, mas sua posição e a posição da cauda N terminal são desconhecidas.

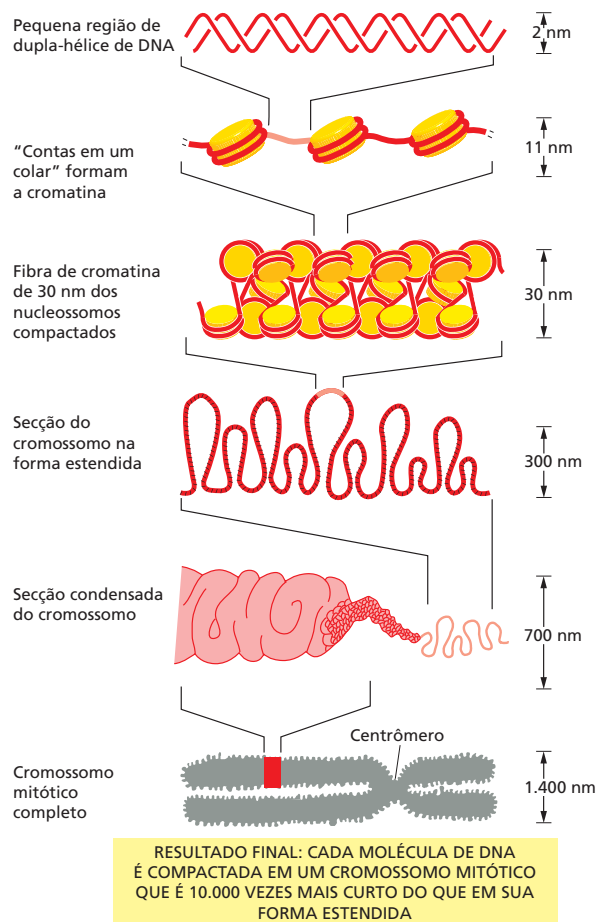



Figura 5-25 O empacotamento do DNA ocorre em vários níveis nos cromossomos. Esse desenho esquemático mostra alguns dos níveis de compactação que, se acredita, ocorrem para formar o cromossomo mitótico altamente condensado.

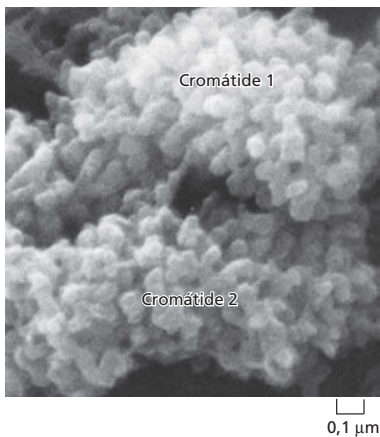



Figura 5-26 Os cromossomos mitóticos são formados de cromatina altamente compactada. Essa micrografia eletrônica de varredura mostra a região próxima a uma das extremidades de um típico cromossomo mitótico. Cada projeção em forma nodular representa a ponta de uma alça de cromatina. O cromossomo dessa figura foi duplicado, e os dois novos cromossomos (também denominados cromátides) ainda são mantidos unidos (ver Figura 5-17). As extremidades dos dois cromossomos estão facilmente visíveis à direita dessa micrografia. (De M.P. Marsden e U.K. Laemmli, *Cell* 17: 849-858, 1989. Com permissão de Elsevier.)

sabe-se que a fibra de 30 nm é ainda organizada em alças e que essas são ainda mais condensadas para formar o cromossomo interfásico. Finalmente, acredita-se que esse cordão compacto de alças sofre pelo menos mais um nível de empacotamento para formar o cromossomo mitótico (**Figura 5-26**; ver Figura 5-25).

A REGULAÇÃO DA ESTRUTURA DOS CROMOSSOMOS

Até o momento, discutimos como o DNA é cuidadosa e firmemente compactado em cromatina. Agora veremos como essa compactação pode ser dinâmica, permitindo o rápido acesso ao DNA. O DNA celular possui uma enorme quantidade de informações codificadas, e as células devem ser capazes de adquiri-las sempre que necessário.

Nesta seção, discutiremos como uma célula pode alterar a estrutura de sua cromatina para expor determinadas regiões do DNA e permitir o acesso a proteínas específicas, principalmente àquelas envolvidas na expressão gênica e no reparo e na replicação do DNA. Então discutiremos como a estrutura da cromatina é estabelecida e mantida e como uma célula passa adiante algumas formas dessa estrutura para suas descendentes. A regulação e a herança da estrutura da cromatina são importantes no desenvolvimento e no crescimento dos organismos eucarióticos.

QUESTÃO 5-4

As proteínas histonas estão entre as proteínas mais conservadas dos eucariotos. As proteínas histonas H4 de uma ervilha e de uma vaca, por exemplo, diferem em apenas 2 dos 102 aminoácidos. Uma comparação entre as sequências gênicas apresenta mais diferenças, mas somente duas delas mudam o aminoácido codificado. Essas observações indicam que as mutações que envolvem troca de aminoácidos não são selecionadas. Por que você acha que as mutações que alteram os aminoácidos dos genes das histonas são deletérios?

As mudanças na estrutura dos nucleossomos permite o acesso ao DNA

As células eucarióticas apresentam várias maneiras de ajustar rapidamente a estrutura local de sua cromatina. Uma estratégia apresenta a vantagem dos **complexos de remodelamento da cromatina**, uma maquinaria de proteínas que usa a energia da hidrólise do ATP para mudar a posição do DNA ao redor dos nucleossomos. Ao empurrar o DNA firmemente condensado à medida que eles se movem, esses complexos podem afrouxar (descondensar) o DNA subjacente, tornando-o mais acessível a outras proteínas (**Figura 5-27**). Durante a mitose, pelo menos alguns dos complexos de remodelamento da cromatina são inativados, o que pode auxiliar a manter a estrutura altamente compactada dos cromossomos mitóticos.

Outra estratégia para a mudança na estrutura da cromatina reside na modificação química reversível das histonas. As caudas de cada uma das quatro proteínas histonas do cerne são particularmente sujeitas a essas modificações covalentes. Por exemplo, grupos acetila, fosfato ou metila podem ser adicionados ou removidos após o nucleossomo ter sido reunido por enzimas localizadas no núcleo. Essas modificações das caudas das histonas apresentam pouco efeito direto na estabilidade de um determinado nucleossomo. No entanto, algumas parecem afetar diretamente a estabilidade da fibra de cromatina de 30 nm e de algumas estruturas de ordem superior discutidas anteriormente.

Entretanto, essas modificações afetam a capacidade das caudas das histonas modificadas de ligar e atrair proteínas específicas para determinados segmentos de cromatina. Diferentes padrões de modificações das caudas das histonas atraem diferentes proteínas. Algumas dessas proteínas causam compactação ainda maior na cromatina, ao passo que outras facilitam o acesso ao DNA pela descompactação da cromatina. Combinações específicas de modificações nas caudas e das proteínas que nelas se ligam podem sinalizar diferentes ações para

Figura 5-27 Complexos de remodelamento da cromatina reposicionam o DNA ao redor do nucleossomo. (A) Repetidos ciclos de hidrólise de ATP permitem que o complexo de remodelamento da cromatina libere o DNA do nucleossomo empurrando-o no cerne de histonas. Isso reposiciona (desloca) o nucleossomo, expondo o DNA a outras proteínas ligadoras de DNA. Nessa figura, o nucleossomo foi levemente movido para a esquerda ao longo do DNA. Muitos ciclos de hidrólise de ATP são necessários para produzir tais mudanças. (B) Múltiplas séries de deslizamento dos nucleossomos podem descondensar a cromatina, permitindo o acesso de outras proteínas ao DNA na célula. Ao contrário, outros tipos de deslizamento podem condensar a cromatina em uma determinada região cromossômica.

a célula. Por exemplo, um padrão pode indicar que um determinado segmento de cromatina acabou de ser replicado, e outro padrão pode indicar que os genes naquele segmento de cromatina devem ser expressos (**Figura 5-28**).

Assim como ocorre nos complexos de remodelamento da cromatina, as enzimas que modificam as caudas das histonas são cuidadosamente reguladas. Elas são levadas a uma determinada região da cromatina por outros sinais, principalmente por suas interações com proteínas que se ligam a sequências de DNA específicas (discutiremos a respeito dessas proteínas no Capítulo 8). As enzimas

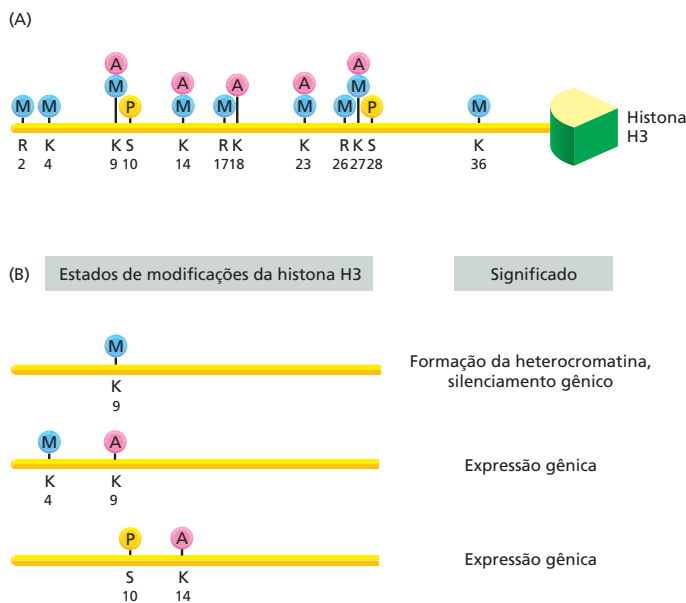



Figura 5-28 O padrão de modificação das caudas das histonas pode definir como um determinado segmento de cromatina é tratado pela célula. (A) Cada histona pode ser modificada pela ligação covalente de vários grupos químicos diferentes. A histona H3, por exemplo, pode receber um grupo acetila (A), um grupo metila (M) ou um fosfato (P). Os números indicam as posições dos aminoácidos modificados na cadeia proteica. Observe que algumas posições (p. ex., lisinas 9, 14, 23 e 27) podem ser modificadas por mais de uma maneira. Além disso, as lisinas podem ser modificadas por um, dois ou três grupos metila (não apresentado). Observe que a histona H3 contém 135 aminoácidos, a maioria dos quais se encontram em sua região globular (curva) e que a maioria das modificações estão em sua cauda N-terminal. (B) Diferentes combinações de modificações nas caudas das histonas podem conferir um significado específico nos segmentos de cromatina onde os mesmos ocorrem, como indicado. Somente alguns significados dessas modificações são conhecidos.

que modificam as histonas atuam em conjunto com os complexos de remodelamento da cromatina para compactar e relaxar segmentos de cromatina, permitindo que a estrutura da cromatina local mude rapidamente de acordo com as necessidades da célula.

Os cromossomos em interfase contêm a cromatina tanto na forma condensada como na forma mais estendida

A alteração da compactação localizada da cromatina por meio de complexos de remodelamento e modificação de histonas tem efeito importante na estrutura geral dos cromossomos interfásicos. Nesses cromossomos, a cromatina não está uniformemente compactada. No entanto, as regiões que contêm os genes que são expressos estão, em geral, na forma mais estendida ou relaxada, e outras que contêm genes quiescentes estão mais compactadas. Assim, a estrutura detalhada de um cromossomo interfásico pode diferir de um tipo celular para outro, dependendo de quais genes estão sendo expressos.

A forma mais altamente condensada da cromatina interfásica é denominada **heterocromatina** (do grego *heteros,* que significa "diferente" mais cromatina). Na década de 1930, a heterocromatina foi observada pela primeira vez, sob microscópio de luz direta, como uma região discreta e fortemente corada na massa de cromatina. A heterocromatina normalmente compõe cerca de 10% do cromossomo interfásico e, nos cromossomos de mamíferos, concentra-se ao redor da região dos centrômeros e dos telômeros nas extremidades dos cromossomos. A formação da forma mais comum de heterocromatina é induzida por um determinado grupo de modificações nas caudas das histonas, incluindo a metilação do resíduo da lisina 9 na histona 3 (ver Figura 5-28). Essas modificações atraem um grupo de proteínas específicas de heterocromatina que induzem as mesmas modificações nas caudas das histonas nos nucleossomos adjacentes. Por sua vez, as novas modificações nas caudas recrutam o mesmo grupo de proteínas específicas de heterocromatina, causando uma onda de propagação da cromatina condensada por todo o cromossomo. Desse modo, estabelece-se um grande segmento de heterocromatina no DNA.

A maior parte do DNA que está permanentemente compactada em heterocromatina em uma célula não contém genes. Em virtude do alto grau de compactação da heterocromatina, os genes que acidentalmente se tornam compactados em heterocromatina em geral não podem ser expressos (**Figura 5-29**). Essa compactação inadequada dos genes em heterocromatina pode causar doenças. No homem, o gene que codifica a β-globina, que forma parte da molécula de hemoglobina que transporta o oxigênio, está localizado próximo a uma região de cromatina condensada. Se, em virtude de uma deleção hereditária do DNA, essa região da heterocromatina se espalha, o gene da β-globina se torna pouco expresso, e o indivíduo desenvolve uma forma grave de anemia.

Talvez o exemplo mais marcante do uso da heterocromatina para manter os genes inibidos ou *silenciados* é encontrado no cromossomo X interfásico das fêmeas de mamíferos. As células das fêmeas contêm dois cromossomos X, e as células dos machos contêm um cromossomo X e um Y. Em virtude da letalidade da dose dupla de produtos do cromossomo X, as fêmeas de mamíferos evoluíram

Figura 5-29 A expressão de um gene pode ser alterada movendo-o para outro local do genoma. Esta figura mostra dois exemplos de *efeito de posição*, no qual a atividade de um gene depende de sua posição ao longo do cromossomo. O gene *White* na mosca-das-frutas *Drosophila* controla a produção de pigmento do olho e possui esse nome em virtude da mutação que levou à primeira identificação. Moscas tipo selvagens com o gene *White* normal *(White$^+$)* produzem pigmentação normal, conferindo-lhes olhos vermelhos, mas se o gene *White* está mutado e inativado, as moscas mutantes *(White$^-$)* não produzem pigmento e possuem olhos brancos. Nas moscas selvagens, o gene *White* (apresentado em *amarelo*) está localizado a uma determinada distância próxima à heterocromatina (*verde*). Uma sequência especial de barreira (*vemelho*) impede que a heterocromatina se espalhe pelas áreas vizinhas do cromossomo. Em moscas nas quais uma inversão de uma região do cromossomo transfere o gene *White$^+$* normal para uma região próxima de heterocromatina que desloca a sequência de barreira, os olhos são manchados com regiões vermelhas e brancas. As regiões brancas representam aquelas células cujo gene *White$^+$*, foi silenciado pelos efeitos da heterocromatrina, as manchas vermelhas representam as células que expressam o gene *White$^+$*, porque a heterocromatina não se dispersou ao mesmo tempo, neste gene, no início do desenvolvimento quando foram formadas as células fundadoras dessas manchas. A presença de grandes manchas de células vermelhas e brancas indica que o estado do gene (se ativo ou silenciado) foi estabelecido no início do desenvolvimento e herdado pela progênie celular a partir de então.

Figura 5-30 Um cromossomo X pode ser completamente inativado pela formação da heterocromatina. As células do embrião inicial das fêmeas dos mamíferos contêm dois cromossomos X, um recebido da mãe (X_m) e o outro recebido do pai (X_p). Nos primeiros estágios do desenvolvimento, um desses dois cromossomos, em cada célula, torna-se aleatoriamente condensado em heterocromatina. Em cada divisão celular, após esse estágio, o mesmo cromossomo se torna condensado em todas as células descendentes da célula original. No camundongo, a inativação do cromossomo X ocorre entre o terceiro e o sexto dia de desenvolvimento embrionário. No homem, a inativação do X também ocorre no início do desenvolvimento, antes que as células tenham se comprometido com uma via de desenvolvimento específica. Assim, as fêmeas apresentam um mosaico de células, portanto, um cromossomo X materno ou paterno, inativado. Na maioria dos tecidos e órgãos, cerca de metade das células será de um tipo e a outra metade será de outro.

um mecanismo para inativar permanentemente um dos dois cromossomos X em cada célula. Ao acaso, um ou outro cromossomo X em cada célula se torna altamente condensado em heterocromatina no início do desenvolvimento embrionário. Desde então, em todas as células da progênie, o estado inativado e condensado daquele cromossomo X é herdado (Figura 5-30).

O restante da cromatina interfásica é denominado **eucromatina** (do grego *eu* significando "verdadeiro" ou "normal", mais cromatina). Embora se use o termo eucromatina para nos referirmos à cromatina que se encontra em um estado mais relaxado do que a heterocromatina, sabe-se agora que tanto a cromatina quanto a heterocromatina são compostas de uma mistura de diferentes estruturas de cromatina, cada uma delas estabelecida e mantida por um grupo distinto de modificações nas caudas das histonas que atraem diferentes grupos de proteínas não histonas (Figura 5-31).

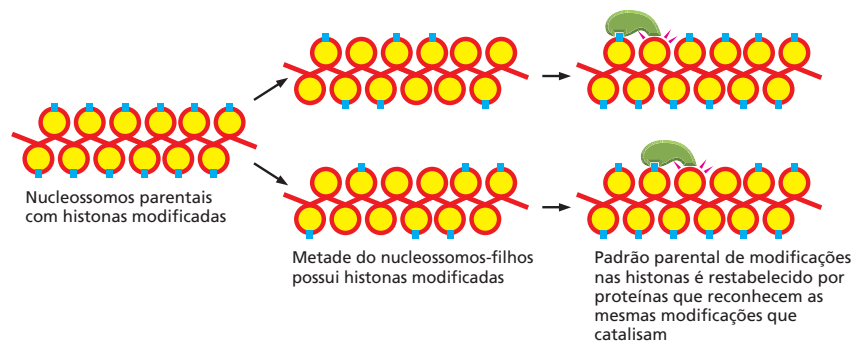
QUESTÃO 5-5

As mutações em um determinado gene do cromossomo X resultam em cegueira para cor. Todos os homens portadores de um gene mutante são cegos para cor. A maioria das mulheres portadoras do gene mutante possui visão normal, mas veem as imagens coloridas com resolução reduzida, porque suas células-cone funcionais (as células que contêm os fotorreceptores de cor) estão mais espaçadas do que na retina normal. Você pode dar uma explicação plausível para essa observação? Se uma mulher é cega para cores, o que você poderia dizer a respeito de seu pai? E a respeito de sua mãe? Explique suas respostas

As mudanças na estrutura da cromatina podem ser herdadas

Como vimos, determinados tipos de estrutura da cromatina podem ser passados de uma célula para sua descendente. Por exemplo, a progênie de uma célula na qual uma cópia do cromossomo X materno está condensado e inativado, também irá condensar e inativar seu cromossomo X materno. Como é possível tal herança da estrutura da cromatina? Quando uma célula replica seu genoma, cada hélice de DNA filha recebe metade das suas proteínas histonas parentais.

Figura 5-31 A estrutura da cromatina varia ao longo de um único cromossomo interfásico. Como indicado de maneira esquemática com diferentes cores, a heterocromatina e a eucromatina representam uma séria de estruturas distintas de cromatina com diferentes graus de extensão e condensação. Geralmente, a heterocromatina está mais condensada do que a eucromatina.

Figura 5-32 As modificações nas histonas podem ser herdadas pelos cromossomos-filhos. Quando um cromossomo é replicado, as suas histonas são distribuídas mais ou menos aleatoriamente nas duas hélices de DNA filhas. Assim, cada cromossomo-filho irá herdar cerca de metade da coleção parental de histonas modificadas. Os outros segmentos de DNA receberão histonas ainda não modificadas recém-sintetizadas. Nesse momento, as proteínas que reconhecem uma determinada modificação podem ligar-se à cromatina e catalisar a formação da mesma modificação na nova histona. Isso pode restaurar o padrão de modificação parental e, em ultima instância, permitir a herança da estrutura da cromatina parental. Esse mecanismo parece ser aplicável a alguns tipos de modificações nas histonas, mas não em todos.

As modificações covalentes associadas ao tipo de estrutura da cromatina que estava presente em cada região específica do cromossomo parental também são herdadas com essas proteínas histonas. Assim, cada cromossomo-filho inicialmente irá conter um grupo misto de dois tipos de nucleossomos: aqueles que contêm as histonas modificadas que foram herdadas desse cromossomo parental e aquelas que contêm histonas recém-sintetizadas, as quais ainda não foram modificadas. Nesse momento, as proteínas que reconhecem as histonas modificadas podem ligar-se às histonas parentais e depositar o mesmo tipo de modificação nas histonas vizinhas virgens, restabelecendo o padrão da estrutura da cromatina encontrada no cromossomo parental (Figura 5-32).

A capacidade de herdar a estrutura localizadas na cromatina auxilia as células eucarióticas a "lembrar" se o gene estava ativo na célula parental, um processo que parece ser crucial para o estabelecimento e a manutenção de diferentes tipos celulares, tecidos e órgãos durante o desenvolvimento e o crescimento de um organismo multicelular complexo. Esse tipo de herança não envolve a passagem de sequências de DNA específicas de uma geração celular para outra, mas depende da passagem de proteínas histonas especificamente modificadas. Esse é um exemplo de **herança epigenética** (do grego *epi* = sobre), porque está sobreposta na herança genética com base no DNA. Outras formas de herança epigenética serão discutidas no Capítulo 8.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- **A vida depende do armazenamento estável e compacto da informação genética.**
- **A informação genética está localizada em moléculas de DNA muito longas e codificada em uma sequência linear de nucleotídeos A, T, C e G.**
- **Cada molécula de DNA é uma dupla-hélice composta de um par de fitas complementares de nucleotídeos mantidas juntas por pontes de hidrogênio entre os pares de bases G-C e A-T.**
- **A fita de DNA possui uma polaridade química devida à ligação dos açúcares alternados com os fosfatos no seu esqueleto. As duas fitas de DNA da dupla-hélice são antiparalelas, isto é, estão em orientações opostas.**
- **O material genético de uma célula eucariótica está contido em um ou mais cromossomos, cada um formado por uma longa molécula de DNA única que contém muitos genes.**
- **Quando um gene que codifica uma proteína é expresso, parte de sua sequência nucleotídica é copiada em RNA, que então coordena a síntese de uma proteína específica.**
- **O DNA que forma cada cromossomo eucariótico contém, além dos genes, muitas origens de replicação, um centrômero e dois telômeros. Essas sequências asseguram que o cromossomo possa ser replicado eficientemente e passado para as células-filhas.**

- **Os cromossomos das células eucarióticas consistem em DNA fortemente ligado a uma massa de proteínas especializadas. Essas proteínas dobram o DNA em uma forma mais compacta. O complexo de DNA e proteínas nos cromossomos é denominado cromatina.**
- **As proteínas cromossomais mais abundantes são as histonas, as quais compactam o DNA em arranjos repetidos de partículas de DNA e proteínas denominados nucleossomos.**
- **Os nucleossomos se agrupam, com o auxílio de moléculas de histona H1, para formar uma fibra de 30 nm. Essa fibra é, geralmente, mais dobrada e torcida, produzindo estruturas de cromatina ainda mais compactas.**
- **A estrutura da cromatina é dinâmica. Descompactando temporariamente sua estrutura, por meio do uso de complexos de remodelamento da cromatina e enzimas que modificam covalentemente as histonas, a célula pode garantir que as proteínas envolvidas na expressão gênica, na replicação e no reparo tenham acesso rápido e localizado às sequências de DNA necessárias.**
- **Algumas formas da cromatina possuem um padrão de histonas com modificações em suas caudas que fazem com que o DNA se torne tão extremamente compactado que os genes não podem ser expressos para produzir RNA e proteínas.**
- **A estrutura da cromatina pode ser transmitida de uma célula para sua descendente, produzindo uma forma de herança epigenética que auxilia a célula a lembrar o estado de expressão gênica de sua célula parental.**

TERMOS-CHAVE

pares de bases
ciclo celular
centrômero
cromatina
complexo de remodelamento da cromatina
cromossomo
complementaridade
ácido desoxirribonucleico (DNA)
dupla-hélice
herança epigenética
eucromatina
gene
genoma
heterocromatina
histona
cariótipo
nucléolo
nucleossomo
origem de replicação
telômero

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 5-6

A. A sequência de nucleotídeos de uma das fitas de uma dupla-hélice de DNA é

5′-GGATTTTTGTCCACAATCA-3′.

Qual é a sequência da fita complementar?

B. No DNA de certas células bacterianas, 13% dos nucleotídeos são adenina. Qual é a porcentagem dos outros nucleotídeos?

C. Quantas sequências de nucleotídeos são possíveis para um segmento de DNA de *N* nucleotídeos de comprimento se ele for (a) fita simples e (b) fita dupla?

D. Suponha que você tenha um método para cortar o DNA em sequências específicas de nucleotídeos. Quantos nucleotídeos de comprimento (em média) essa sequência teria para fazer apenas um corte no genoma bacteriano de 3×10^6 pares de nucleotídeos? A resposta seria diferente para o genoma de uma célula animal que contém 3×10^9 pares de nucleotídeos?

QUESTÃO 5-7

Um par de bases A-T é estabilizado por somente duas pontes de hidrogênio. Um esquema de pontes de hidrogênio de forças similares pode ocorrer entre outras combinações de bases, como os pares A-C e A-G, como mostra a **Figura Q5-7**. O que aconteceria se esses pares se formassem durante a replicação do DNA e se bases erradas fossem incorporadas? Discuta por que isso não acontece frequentemente. (Dica: ver Figura 5-6.)

QUESTÃO 5-8

A. Uma macromolécula é isolada de uma fonte extraterrestre que superficialmente se assemelha ao DNA, mas, após um exame mais cuidadoso, observa-se que a estrutura das bases é muito diferente (**Figura Q5-8**). Bases V, W, X e Y substituem

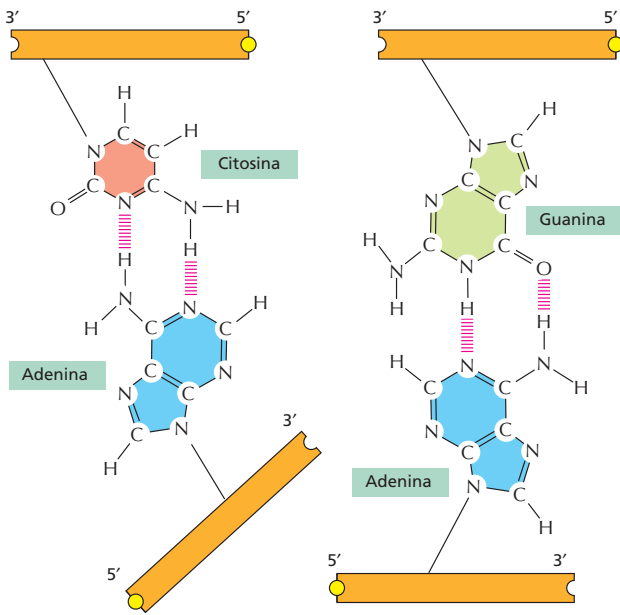



Figura Q5-7

Figura Q5-8

as bases A, T, G e C. Olhe essas estruturas mais atentamente. Essas moléculas semelhantes ao DNA podem ter sido derivadas de um organismo vivo que usa o princípio de herança genética similar àquele usado pelas células da Terra? Caso afirmativo, o que você pode dizer sobre suas propriedades?

B. Julgando simplesmente pelo potencial das pontes de hidrogênio, poderiam essas bases extraterrestres substituir as bases terrestres A, T, G e C? Explique sua resposta.

QUESTÃO 5-9

As duas fitas do DNA de dupla-hélice podem ser separadas pelo aquecimento. Se você aumentar a temperatura de uma solução contendo uma das seguintes moléculas de DNA, em que ordem você espera que elas se separem? Explique sua resposta.

A. **5′**–GCGGGCCAGCCCGAGTGGGTAGCCCAGG–**3′**
3′–CGCCCGGTCGGGCTCACCCATCGGGTCC–**5′**

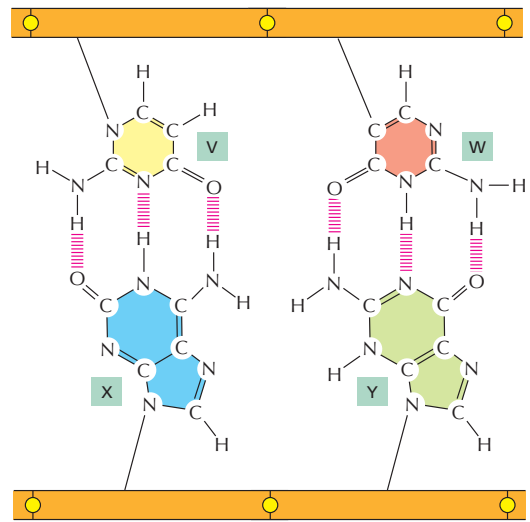
B. **5′** –ATTATAAAATATTTAGATACTATATTTACAA–**3′**
3′–TAATATTTTATAAATCTATGATATAAATGTT–**5′**

C. **5′** –AGAGCTAGATCGAT–**3′**
3′–TCTCGATCTAGCTA –**5′**

QUESTÃO 5-10

O tamanho total do DNA do genoma humano é cerca de 1 m, e o diâmetro da dupla-hélice é cerca de 2 nm. Os nucleotídeos da dupla-hélice de DNA estão posicionados a intervalos de 0,34 nm. Se o DNA for aumentado de modo que seu diâmetro seja equivalente ao de uma extensão de fio elétrico (5 mm), qual será o comprimento da extensão de ponta à ponta (assumindo que ele esteja completamente esticado)? Quão próximas estarão as bases? Qual seria o comprimento de um gene de 1.000 pares de nucleotídeos?

QUESTÃO 5-11

Um CD (disco compacto) armazena cerca de $4,8 \times 10^9$ bites de informação em 96 cm^2 de área. Essa informação é armazenada com um código binário, isto é, cada bite é 0 ou 1.

A. Quantos bites seriam necessários para especificar cada par de nucleotídeos em uma sequência de DNA?

B. Quantos CDs seriam necessários para armazenar a informação contida no genoma humano?

QUESTÃO 5-12

Qual das seguintes afirmativas está correta? Explique sua resposta.

A. Cada cromossomo eucarioto deve conter os seguintes elementos na sequência de DNA: múltiplas origens de replicação, dois telômeros e um centrômero.

B. As partículas do cerne do nucleossomo possuem 30 nm de diâmetro e, quando alinhadas, formam os filamentos de 30 nm.

QUESTÃO 5-13

Defina os seguintes termos e sua relação uns com os outros:

A. Cromossomo interfásico
B. Cromossomo mitótico
C. Cromatina
D. Heterocromatina
E. Histonas
F. Nucleossomo

QUESTÃO 5-14

Considere cuidadosamente o resultado mostrado na **Figura Q5-14**. Cada uma das duas colônias são agrupamentos de aproximadamente 100.000 células de levedura que cresceram a partir de uma única célula que agora se encontra em algum local no centro da colônia. Em levedura, o *Ade2* codifica uma das enzimas da biossíntese de adenina, e a sua ausência de seu produto gênico leva ao acúmulo de pigmento vermelho. Na sua localização cromossômica normal, o *Ade2* é expresso em todas as células. Quando posicionado próximo ao telômero, que é extremamente condensado, o *Ade2* não é mais expresso. Explique por que os setores brancos se formaram próximos às bordas da colônia. Considerando esses setores, o que você pode concluir a respeito da propagação do estado transcricional do gene *Ade2* da célula-mãe para as células-filhas?

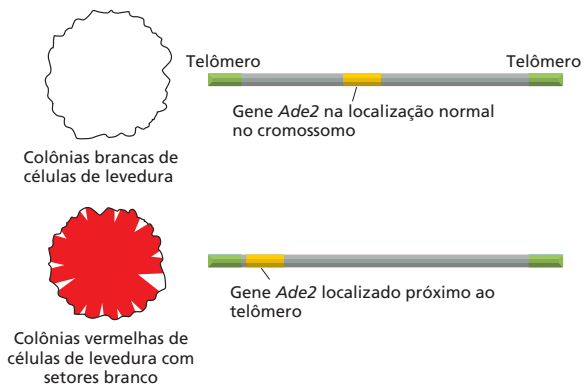



Figura Q5-14

QUESTÃO 5-15

As duas micrografias eletrônicas na **Figura Q5-15** mostram o núcleo de dois tipos celulares diferentes. Você pode dizer, observando essas figuras, quais das duas células está transcrevendo mais os seus genes? Explique como você chegou a essa resposta. (Micrografias cortesia de Don W. Fawcett.)

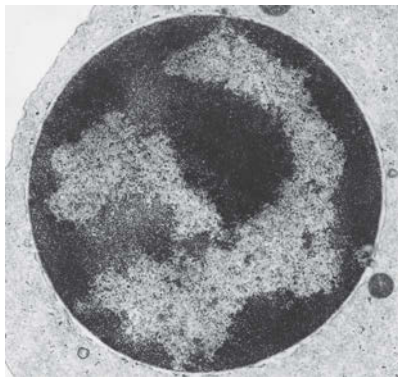
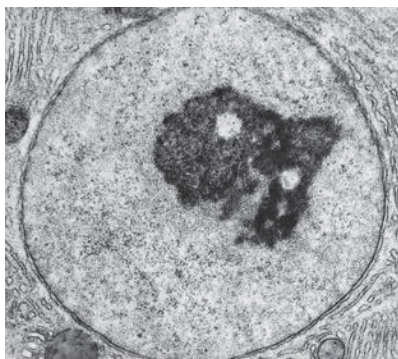
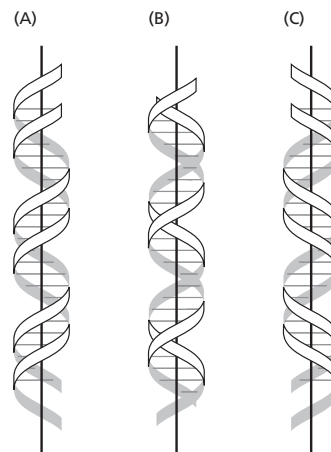



Figura Q5-15

Figura Q5-16

QUESTÃO 5-16

O DNA forma uma hélice voltada para a direita. Mostre qual das hélices apresentadas na **Figura Q5-16** possui uma hélice voltada para a direita.

QUESTÃO 5-17

Um único nucleossomo tem 11 nm de extensão e contém 147 pb de DNA (o DNA da dupla-hélice mede 0,34 nm/pb). Qual é a taxa de compactação (comprimento do DNA em relação ao diâmetro do nucleossomo) que o DNA atinge ao enrolar-se ao redor do octâmero de histonas? Assumindo que há 53 pb adicionais que compõem o DNA de ligação entre os nucleossomos, qual é o grau de condensação do "colar de contas" de DNA em relação ao comprimento total do DNA? Que fração da condensação de 10.000 vezes que ocorre na mitose é representada por esse primeiro grau de compactação?

QUESTÃO 5-18

Acredita-se que a herança epigenética da estrutura da cromatina desempenha um importante papel na especificação de diferentes tipos celulares nos organismos vertebrados. Por que esse mecanismo de herança célula à célula seria preferível ao mecanismo hipotético que altera a sequência de DNA em locais específicos no DNA em determinadas células durante o desenvolvimento embrionário?

CAPÍTULO 6

Replicação, Reparo e Recombinação do DNA

A capacidade de uma célula manter a ordem em um ambiente caótico depende da duplicação precisa da enorme quantidade de material genético contido no seu DNA. Esse processo de duplicação, chamado de *replicação do DNA*, deve ocorrer antes que uma célula possa produzir duas células-filhas geneticamente idênticas. A manutenção da ordem em uma célula também exige uma vigilância contínua e reparos na sua informação genética, uma vez que o DNA está sujeito a danos causados por compostos químicos e radiações do ambiente e por moléculas reativas produzidas dentro da célula. Neste capítulo, descreveremos as maquinarias proteicas que promovem a replicação e o reparo do DNA da célula. Essas maquinarias catalisam alguns dos processos mais rápidos e precisos que ocorrem dentro das células, sendo que as suas ações refletem a elegância e a eficiência da química celular.

Embora existam sistemas para proteger a instrução genética dos erros de cópia e de lesões acidentais, alterações permanentes, ou *mutações*, ocorrem ocasionalmente. Muitas dessas mutações não afetam o organismo de maneira significativa; porém, algumas possuem consequências severas. Às vezes, essas alterações podem ser benéficas ao organismo: por exemplo, mutações que tornam uma bactéria resistente a antibióticos que seriam usados para eliminá-la. O acúmulo das alterações sofridas pelo DNA durante milhões de anos promoveu a variedade de material genético que diferencia uma espécie da outra, como discutido no Capítulo 9. As mutações também produzem as discretas variações que resultam nas diferenças entre indivíduos da mesma espécie, facilmente identificadas nos humanos e em outros animais (**Figura 6-1**).

Contudo, as mutações também podem ser prejudiciais: nos humanos, são responsáveis por milhares de doenças genéticas hereditárias e diversos tipos de câncer.

Figura 6-1 A informação hereditária é transmitida fielmente de geração à geração. Entretanto, alterações no DNA podem produzir as variações que resultam nas diferenças entre indivíduos da mesma espécie – ou, com o passar do tempo, as diferenças entre uma espécie e outra. Nessa foto de família, as crianças assemelham-se entre si e aos seus pais, mais do que a outras pessoas, porque herdaram os seus genes de seus pais. Gatos e humanos possuem várias características comuns, mas durante os milhões de anos evolutivos que separaram gatos e humanos, ambos acumularam inúmeras alterações genéticas que resultaram em espécies bastante diferentes. A galinha é um parente ainda mais distante.

Portanto, a sobrevivência de uma célula ou organismo depende da capacidade de manter essas alterações no seu DNA em um nível mínimo. Na ausência de sistemas celulares que realizam continuamente o monitoramento e o reparo do DNA danificado, a existência da vida seria questionável.

Iniciaremos este capítulo apresentando uma revisão dos mecanismos responsáveis pela duplicação e pela manutenção do DNA com um mínimo de mutações. A seguir, iremos considerar algumas das curiosas vias pelas quais a informação genética pode ser alterada, incluindo a *recombinação homóloga* e o movimento de sequências de DNA especiais, presentes em nossos cromossomos, chamadas de *elementos genéticos móveis*. Finalmente, discutiremos os vírus – pouco mais do que alguns genes protegidos por uma capa proteica –, que podem mover-se de uma célula à outra.

REPLICAÇÃO DO DNA

A cada divisão celular, uma célula deve copiar seu genoma com uma precisão extraordinária. Nesta seção, discutiremos como tal precisão é alcançada, ao mesmo tempo em que a duplicação do DNA ocorre em taxas muito elevadas de até 1.000 nucleotídeos por segundo.

O pareamento de bases permite a replicação do DNA

No capítulo anterior, vimos que cada fita da dupla-hélice de DNA contém uma sequência de nucleotídeos que é exatamente complementar à sequência de nucleotídeos da outra fita da hélice. Cada fita pode, portanto, servir de **molde**, ou modelo, para a síntese de uma nova fita complementar (Figura 6-2). Em outras palavras, se designarmos as duas fitas como S e S′, a fita S pode servir como um molde para a síntese de uma nova fita S′, e, ao mesmo tempo, a fita S′ pode atuar como molde para a síntese de uma nova fita S (Figura 6-3). Portanto, a informação genética contida no DNA pode ser copiada com precisão por um processo

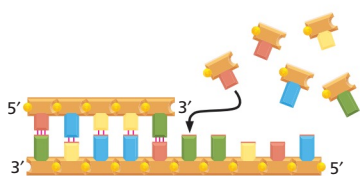



Figura 6-2 Uma fita de DNA pode atuar como um molde. A ligação preferencial ocorre entre os pares de nucleotídeos (A com T, e G com C) que podem formar pares de bases. Isso permite que cada fita sirva de molde na formação da sua fita complementar.

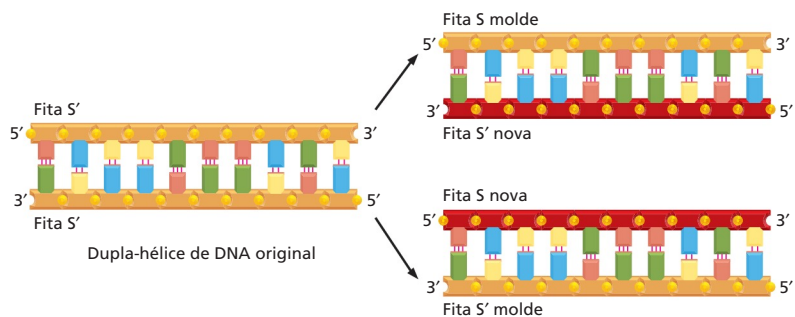
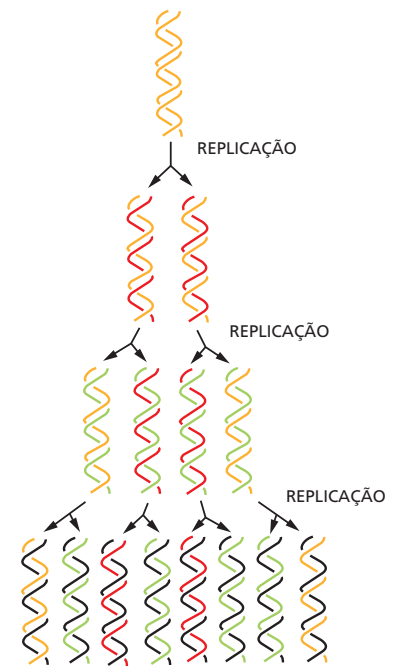



Figura 6-3 O DNA atua como um molde para sua própria duplicação. Como o nucleotídeo A irá formar par apenas com T, e G apenas com C, cada fita de DNA da dupla-hélice – indicada aqui como fita S e sua fita complementar S′ – atua como um molde para especificar a sequência de nucleotídeos na sua fita complementar. Dessa forma, a dupla-hélice de DNA pode ser precisamente copiada. Observe que, apesar de representadas em cores diferentes, as fitas-molde (*em laranja*) e as fitas novas (*em vermelho*) são quimicamente idênticas.

Figura 6-4 A cada ciclo de replicação, cada uma das duas fitas do DNA é usada como molde para a formação de uma fita de DNA complementar. As fitas originais, portanto, permanecem intactas por diversas gerações. A replicação do DNA é "semiconservativa", porque cada dupla-hélice filha é composta por uma fita conservada e por uma fita recém-sintetizada.

simples e elegante, no qual a fita S é separada da fita S' e cada uma atua, separadamente, como molde para a produção de uma nova fita complementar, idêntica à fita complementar original.

A capacidade de cada fita de uma molécula de DNA servir como um molde para a produção de uma fita complementar permite que a célula copie ou *replique* seus genes antes de passá-los a suas descendentes. Entretanto, a tarefa é colossal, pois envolve a duplicação de bilhões de pares de nucleotídeos cada vez que a célula se divide. O processo de cópia deve ocorrer com velocidade e precisão: em cerca de 8 horas, uma célula animal em divisão deverá ter copiado o equivalente a 1.000 livros como este e, em média, não ter mais do que uma ou duas letras erradas. Esse feito é realizado por um grupo de proteínas que juntas formam uma *máquina de replicação*.

A **replicação do DNA** produz duas duplas-hélices completas a partir da molécula original de DNA, cada hélice nova de DNA possui a sequência de nucleotídeos idêntica (exceto pelos raros erros) à dupla-hélice de DNA original (ver Figura 6-3). Como cada fita de DNA original atua com um molde para uma nova fita, cada uma das hélices-filhas de DNA é formada por uma fita original (existente) e outra completamente nova; esse modo de replicação é chamado de *semiconservativo* (**Figura 6-4**). Em **Como Sabemos**, p. 200-202, discutimos os experimentos iniciais que demonstraram que o DNA é replicado desse modo.

A síntese de DNA inicia nas origens de replicação

A dupla-hélice de DNA é normalmente muito estável: as duas fitas de DNA estão firmemente ligadas por um grande número de pontes de hidrogênio entre as bases presentes em ambas as fitas (ver Figura 5-2). Como resultado, apenas temperaturas próximas à temperatura de ebulição da água fornecem a energia térmica necessária para separar essas fitas. Para ser utilizada como molde, a dupla-hélice deve ser primeiramente aberta, as duas fitas separadas para expor as bases não pareadas. Como esse processo ocorre nas temperaturas fisiológicas da célula?

O processo de replicação do DNA começa com proteínas iniciadoras que se ligam ao DNA e provocam a abertura das fitas, quebrando as pontes de hidrogênio entre as bases (**Figura 6-5**). Apesar de coletivamente formarem uma hélice bastante estável, cada ponte de hidrogênio individualmente é fraca (discutida no Capítulo 2). A separação de um pequeno segmento de DNA com poucos pares de bases por vez, portanto, não requer uma grande quantidade de energia e pode ocorrer com o auxílio dessas proteínas em temperaturas normais.

Os locais em que ocorre a abertura inicial das fitas de DNA são denominados **origens de replicação** e são geralmente caracterizados por uma sequência específica de nucleotídeos. Em células simples, como bactérias e leveduras, as origens de replicação compreendem cerca de 100 pares de bases; são compostas por sequências de DNA que atraem as proteínas iniciadoras e são segmentos de DNA particularmente fáceis de separar. Vimos no Capítulo 5 que o par de bases A -T é unido por menos pontes de hidrogênio do que o par G-C. Portanto, um segmento de DNA rico em pares de bases A -T é relativamente mais fácil de ser separado e segmentos de pares A-T são normalmente encontrados nas origens de replicação.

Um genoma bacteriano, que é normalmente contido em uma molécula circular de DNA com vários milhões de pares de nucleotídeos, possui uma única origem de replicação.

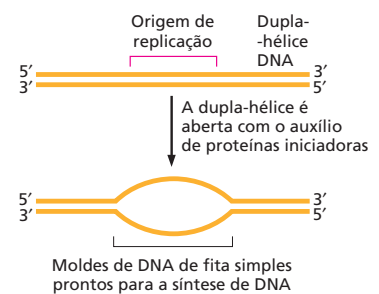



Figura 6-5 A dupla-hélice de DNA é aberta na origem de replicação. Proteínas iniciadoras da replicação reconhecem sequências de DNA nas origens de replicação e separam localmente as duas fitas da dupla-hélice. Assim, as fitas simples expostas atuam como moldes para a cópia do DNA.

COMO SABEMOS:
A NATUREZA DA REPLICAÇÃO

Em 1953, James Watson e Francis Crick publicaram o famoso artigo de duas páginas descrevendo o modelo para a estrutura do DNA (ver Figura 5-2). Nesse artigo, eles propuseram que as bases complementares – adenina e timina, guanina e citosina – formavam pares entre si, voltadas para o centro de uma dupla-hélice, que mantinha as duas fitas de DNA unidas. Bem ao final dessa sucinta e bombástica revelação científica, os pesquisadores comentaram, quase como um aparte, "não escapou ao nosso conhecimento que o pareamento específico que postulamos imediatamente sugere um possível mecanismo para a cópia do material genético".

De fato, um mês após a publicação desse clássico artigo no periódico *Nature*, Watson e Crick publicaram um segundo artigo, sugerindo como o DNA poderia ser duplicado. Nesse artigo, eles propuseram que as duas fitas da dupla-hélice são desenroladas, e cada uma atua como um molde para a síntese de uma fita-filha complementar. Nesse modelo, chamado de replicação *semiconservativa*, cada nova molécula de DNA consiste em uma fita derivada da molécula original e uma outra fita sintetizada completamente nova (**Figura 6-6A**).

Sabemos hoje que o modelo de Watson e Crick para a replicação do DNA estava correto – mas ele não foi totalmente aceito no início. Um respeitado médico que virou geneticista, Max Delbrück, entre outros, ficou intrigado com o que chamou de "o problema do desenrolamento"; isto é: como as duas fitas da dupla-hélice, enroladas uma sobre a outra tantas vezes ao longo do comprimento, poderiam ser desenroladas sem que isso causasse um grande e confuso emaranhamento? A concepção de Watson e Crick de que a hélice de DNA se abriria do modo similar a um zíper parecia, a Delbrück, fisicamente improvável e simplesmente "muito deselegante para ser eficiente".

Em vez disso, Delbrück propôs que a replicação do DNA ocorreria por meio de diversas quebras e religações, nas quais o esqueleto de DNA seria rompido e as fitas copiadas em pequenos fragmentos – talvez com apenas 10 nucleotídeos por vez – antes de serem religadas. Nesse modelo, chamado mais tarde de *dispersivo*, as cópias resultantes seriam conjuntos híbridos de DNA original e novo, cada fita contendo uma mistura dos dois (Figura 6-6B). O desenrolamento não seria necessário.

Houve ainda um terceiro grupo que propôs a ideia de que a replicação seria *conservativa*: a hélice original de alguma forma seria mantida inteiramente intacta após a duplicação, e a molécula-filha seria formada por duas fitas de DNA inteiramente novas (Figura 6-6C). Para determinar qual desses modelos estava correto, um experimento era necessário – um que pudesse revelar a composição das fitas de DNA recém-sintetizadas. Foi isso que Matt Meselson e Frank Stahl demonstraram.

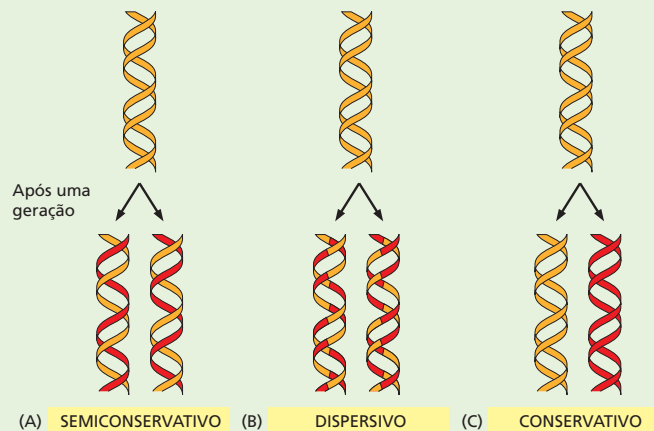



Figura 6-6 Três modelos para a replicação do DNA com diferentes resultados. (A) No modelo semiconservativo, cada fita original atua como molde para a síntese de uma nova fita-filha. O primeiro ciclo de replicação produz duas moléculas híbridas, cada uma contendo uma fita original e uma fita nova recém-sintetizada. Um próximo ciclo de replicação produz duas moléculas híbridas e duas moléculas que não contêm nenhuma fita original do DNA. (B) No modelo dispersivo, cada geração de hélices duplas de DNA contêm uma mistura de fragmentos da fita original e material recém-sintetizado. (C) No modelo conservativo, a molécula original permanece intacta após ser copiada. Para cada modelo, as moléculas de DNA original estão mostradas em *laranja*, e o DNA recém-replicado, em *vermelho*. Observe que apenas um pequeno segmento de DNA é mostrado para cada modelo.

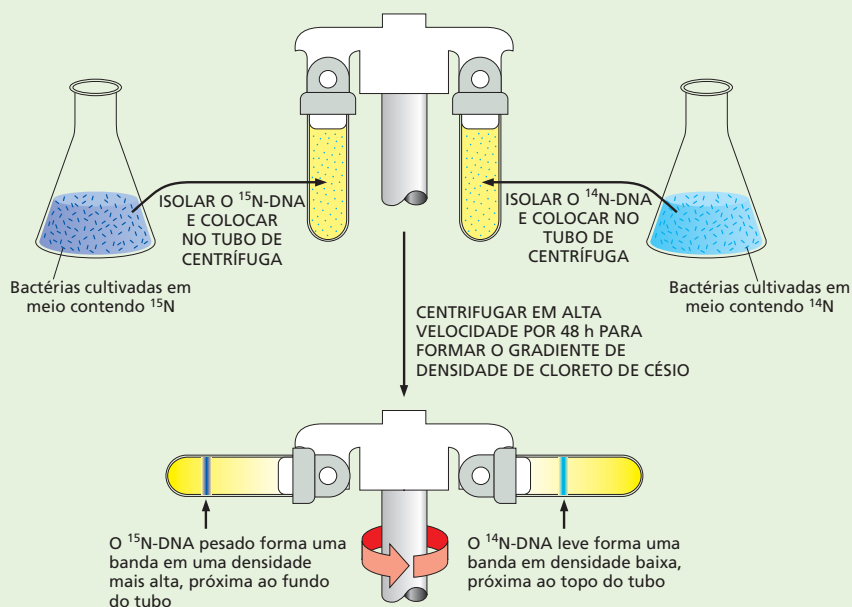



Figura 6-7 A centrifugação em gradiente de cloreto de césio permite a separação de DNA leve e pesado. As bactérias são cultivadas por várias gerações em um meio contendo ^{15}N (o isótopo pesado) ou ^{14}N (o isótopo leve) para marcar o DNA. A seguir, as células são lisadas e o DNA é colocado em um tubo de ultracentrífuga contendo uma solução salina de cloreto de césio. Os tubos são centrifugados em alta velocidade por dois dias, para permitir que o DNA se acumule na região na qual sua densidade se aproxime da densidade do sal que o cerca. As moléculas de DNA leve e pesado se acumulam em diferentes posições no tubo.

Meselson era um estudante que trabalhava com Linus Pauling, aplicando um método para determinar a diferença entre proteínas novas e velhas. Após discutir com Delbrück sobre o modelo de replicação de Watson e Crick, ocorreu a Meselson que a estratégia aplicada para explorar a síntese de proteínas talvez também pudesse ser utilizada para o estudo de DNA. No verão de 1954, Meselson conheceu Stahl, na época um estudante em Rochester, NY, e eles concordaram em desenvolver um trabalho em colaboração. Foram necessários alguns anos para que tudo estivesse pronto, mas os dois finalmente realizaram o que ficou conhecido como "o experimento mais belo da biologia".

Sua abordagem, em retrospectiva, foi extremamente direta. Eles iniciaram promovendo o crescimento de duas culturas da bactéria *E. coli*, uma em um meio contendo um isótopo mais pesado do nitrogênio, ^{15}N, e o outro meio contendo o nitrogênio normal, mais leve, ^{14}N. O nitrogênio do meio nutritivo é incorporado às bases nucleotídicas e, então para o DNA do organismo. Após o cultivo das células por várias gerações em ambos meios, contendo ^{15}N e ^{14}N, os pesquisadores tinham dois frascos de bactérias, uma cujo DNA era *pesado*, e o outro cujo DNA era *leve*. Meselson e Stahl então lisaram as células e colocaram o DNA em tubos contendo uma alta concentração do sal cloreto de césio. Durante a centrifugação, o cloreto de césio forma um gradiente de densidade, e as moléculas de DNA se movem pela solução até o ponto em que sua densidade se iguala à densidade do sal (ver Painel 4-4, p. 164-165). Por esse método, chamado de centrifugação em gradiente de densidade, Meselson e Stahl descobriram que poderiam distinguir o DNA pesado (contendo ^{15}N) e o DNA leve (contendo ^{14}N) observando as posições do DNA no gradiente de cloreto de césio. Como o DNA pesado é mais denso do que o DNA leve, ele é recolhido em uma posição mais próxima do fundo do tubo de centrífuga (**Figura 6-7**).

Uma vez estabelecido o método para diferenciar entre o DNA pesado e o leve, Meselson e Stahl testaram as várias hipóteses propostas para a replicação. Eles transferiram uma cultura de bactérias cultivadas em meio com nitrogênio pesado e a transferiram para um frasco com meio contendo o isótopo leve. No início do experimento, todo o DNA seria pesado, porém, à medida que as bactérias se dividissem, o DNA recém-sintetizado seria leve. Assim, eles poderiam monitorar o acúmulo de DNA leve e ver qual modelo melhor explicaria os dados. Após uma geração, foi encontrado que as moléculas originais, com DNA pesado – em que as duas fitas foram produzidas com ^{15}N –, tinham desaparecido e sendo substituídas por um novo tipo de DNA que formava uma banda com densidade exatamente entre as bandas de ^{15}N-DNA e ^{14}N-DNA (**Figura 6-8**). Meselson e Stahl deduziram que essas hélices-filhas recém-sintetizadas eram híbridas – contendo ambos os isótopos leve e pesado.

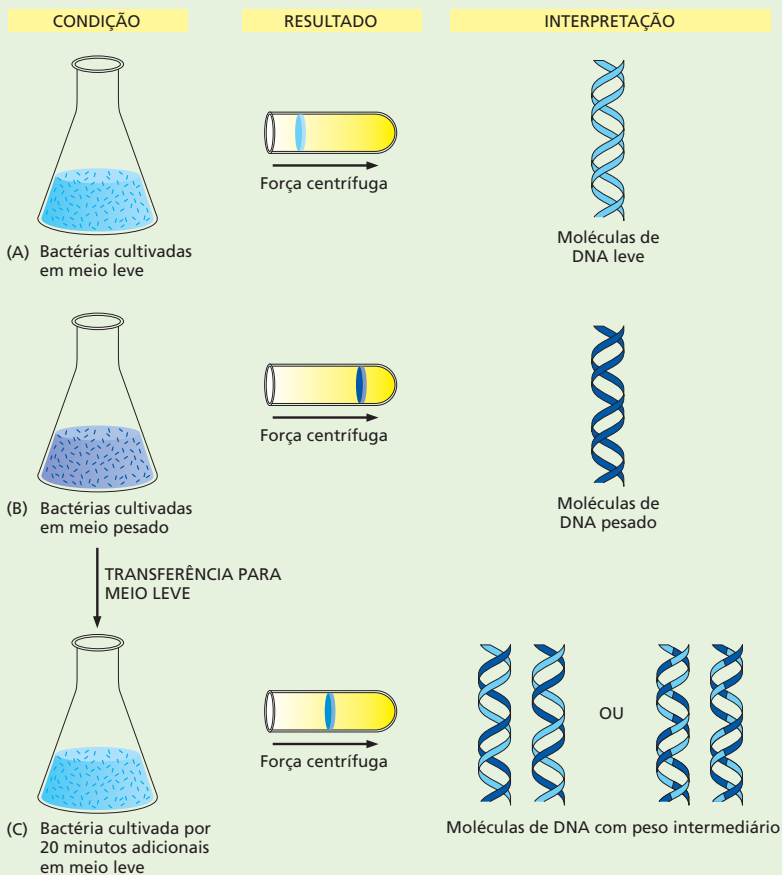



Figura 6-8 A primeira parte do experimento de Meselson-Stahl exclui o modelo conservativo de replicação do DNA. (A) Bactérias cultivadas em meio leve (contendo ^{14}N) produzem DNA que forma uma banda na porção superior do tubo de centrífuga, ao passo que bactérias cultivadas em meio pesado contendo ^{15}N (B) produzem DNA que migra mais para região inferior do tubo. Quando bactérias cultivadas no meio pesado são transferidas para um meio leve e cultivadas por algum tempo para permitir sua divisão, elas produzem uma banda com posição intermediária entre as duas bandas originais (C). Esse resultado descarta o modelo conservativo para replicação, mas não distingue o modelo dispersivo do semiconservativo, ambos preveem a formação de moléculas-filhas híbridas de DNA.

O fato de os resultados serem tão claros – com a formação de bandas compactas nas posições esperadas para as moléculas híbridas de DNA – foi um feliz acidente do protocolo experimental. Os pesquisadores utilizaram uma seringa hipodérmica para colocar as amostras de DNA nos tubos de ultracentrífuga (ver Figura 6-7). No processo, eles, sem querer, fragmentaram o cromossomo bacteriano em segmentos menores. Caso os cromossomos tivessem permanecido inteiros, moléculas de DNA parcialmente replicadas seriam isoladas, uma vez que várias células estariam no meio do processo de cópia do DNA quando coletadas. Moléculas nesse estágio intermediário de replicação não seriam separadas em bandas discretas. Como os pesquisadores estavam, então, trabalhando com fragmentos menores, a chance de estarem completamente replicados – e contendo uma fita original e uma nova – era maior, produzindo, portanto, esses resultados claros e elegantes.

Na hora, essa observação excluía o modelo conservativo de replicação do DNA, que previa que o DNA original permanecesse inteiramente pesado, ao passo que as hélices-filhas seriam 100% leves (ver Figura 6-6C). Os dados sustentavam o modelo semiconservativo, que previa a formação de moléculas híbridas contendo uma fita de DNA pesado e uma fita de DNA leve (ver Figura 6-6A). Esses resultados também eram compatíveis com o modelo dispersivo, em que moléculas híbridas conteriam uma mistura de DNA leve e pesado (ver Figura 6-6B).

Para distinguir esses dois modelos, Meselson e Stahl usaram calor. Quando o DNA é submetido a altas temperaturas, as pontes de hidrogênio que unem as duas fitas são rompidas, e a hélice é separada, resultando em várias fitas simples de DNA. Quando as moléculas híbridas foram aquecidas e depois centrifugadas, foi visto que uma fita de DNA era pesada e que outra era leve. Essa observação deu suporte ao modelo semiconservativo; se o modelo dispersivo fosse o correto, as fitas de DNA resultantes, cada uma contendo uma mistura de fragmentos leves e pesados, teriam formado bandas a uma densidade intermediária.

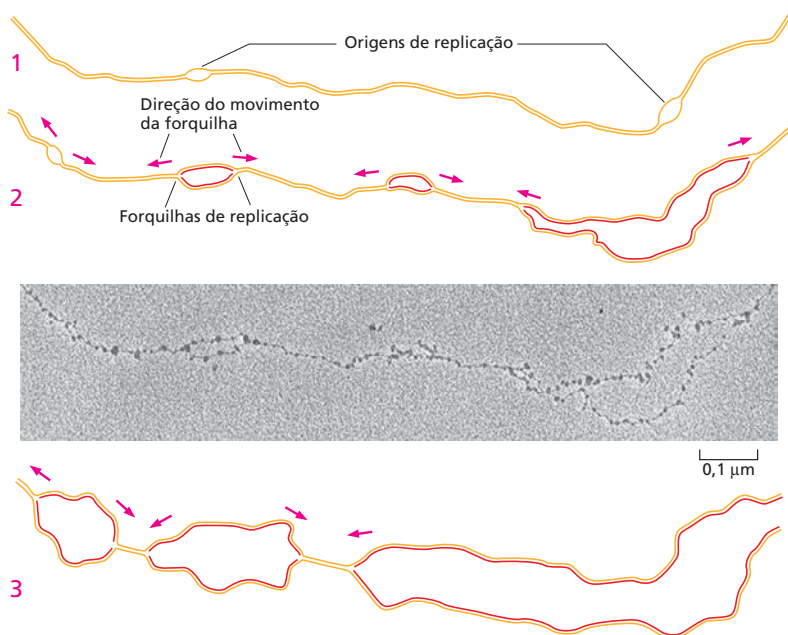
De acordo com o historiador Frederic Lawrence Holmes, o experimento foi tão elegante e claro que Stahl – quando entrevistado para uma posição na Universidade de Yale – foi incapaz de ocupar os 50 minutos alocados para sua palestra. “Eu terminei em 25 minutos”, disse Stahl, “porque é o tempo que leva para explicar o experimento. Ele é totalmente simples e limitado”. Stahl não conseguiu o emprego em Yale, mas seu experimento convenceu os cientistas de que Watson e Crick estavam corretos. Os resultados foram aceitos tão ampla e rapidamente que o experimento foi descrito em livros-texto antes que Meselson e Stahl publicassem os dados.

O genoma humano, que é muito maior, possui aproximadamente 10.000 dessas origens. Em humanos, o início da replicação em vários locais ao mesmo tempo reduz enormemente o tempo necessário para que uma célula copie todo seu genoma.

Uma vez que uma proteína iniciadora se liga ao DNA na origem de replicação e provoca a abertura local da dupla-hélice, um grupo de proteínas que realizam a replicação do DNA é atraído ao local. Essas proteínas formam uma máquina proteica, na qual cada membro desempenha uma função específica. Apresentaremos cada uma dessas proteínas brevemente e a seguir discutiremos o processo global de replicação do DNA.

A síntese de DNA novo ocorre nas forquilhas de replicação

Durante o processo de replicação, estruturas com forma de Y podem ser vistas nas moléculas de DNA, denominadas **forquilhas de replicação** (Figura 6-9). Nessas forquilhas, a máquina de replicação se desloca sobre o DNA, causando a abertura das duas fitas da dupla-hélice e usando cada uma das fitas como um molde para produzir uma nova fita-filha. Duas forquilhas de replicação são formadas a partir de cada origem de replicação, e essas se afastam da origem nas duas direções, separando o DNA à medida que vão se afastando. Dessa forma, a replicação do DNA nos cromossomos bacterianos e eucarióticos é dita *bidirecional*. As forquilhas se deslocam muito rapidamente – cerca de 1.000 pares de nucleotídeos por segundo em bactérias e 100 pares de nucleotídeos por segundo em humanos. A velocidade mais lenta do movimento da forquilha em humanos (e em todos os eucariotos) pode ser devida às dificuldades geradas pela presença da estrutura da cromatina, mais complexa, encontrada nos organismos superiores.

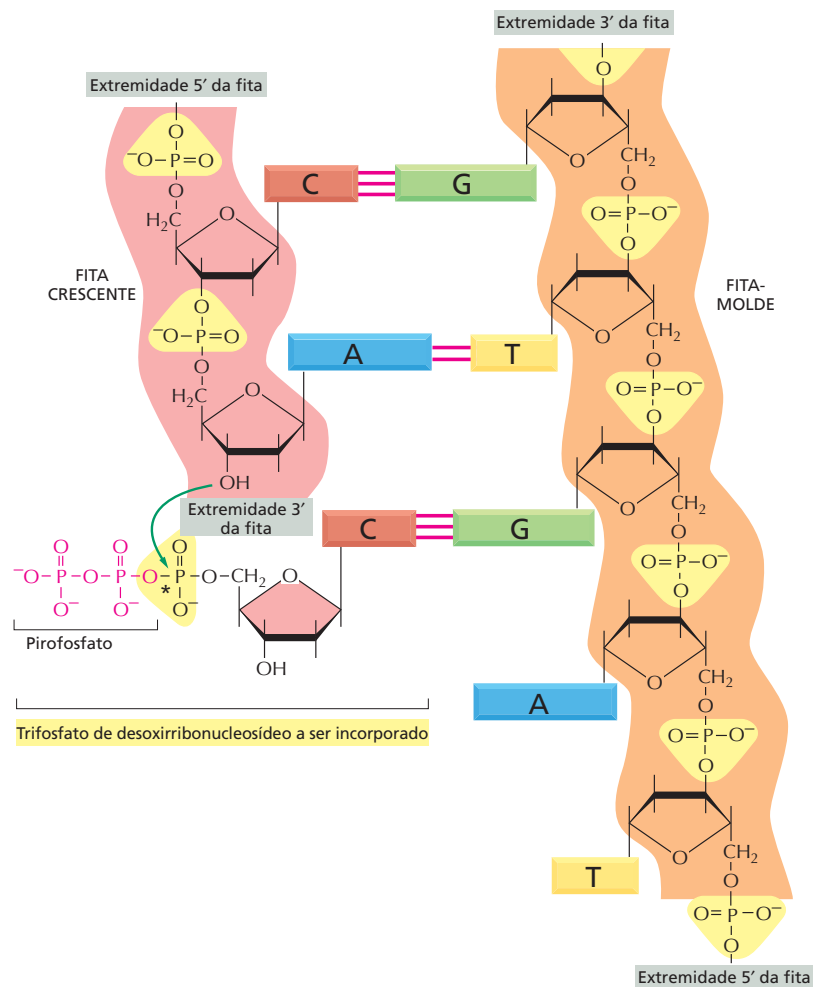
No coração da máquina de replicação está a enzima **DNA-polimerase**, que sintetiza o DNA novo utilizando uma das fitas existentes como molde. Essa enzima catalisa a adição de nucleotídeos à extremidade 3′ de uma cadeia crescente de DNA pela formação da ligação fosfodiéster entre a extremidade 3′ e o grupo 5′-fosfato do nucleotídeo a ser incorporado (Figura 6-10). Os nucleotídeos entram na reação inicialmente como trifosfatos de nucleosídeo que fornecem energia para a polimerização. A hidrólise de uma ligação de alta energia do trifosfato de nucleosídeo fornece a energia para a reação que liga um monômero nucleotídico à cadeia e libera pirofosfato (PP_i).

QUESTÃO 6-1

Observe atentamente a micrografia na Figura 6-9.

A. Usando a barra de escala, estime o comprimento das fitas de DNA entre as forquilhas de replicação. Numerando as forquilhas de replicação em sequência a partir da esquerda, em quanto tempo as forquilhas 4 e 5, e 6 e 7, respectivamente, irão colidir entre si? (Lembre-se de que a distância entre as bases no DNA é 0,34 nm e que a forquilha de replicação de eucariotos se move cerca de 100 nucleotídeos por segundo.) Para essa questão, desconsidere os nucleossomos vistos na micrografia e considere que o DNA está completamente estendido.

B. O genoma da mosca tem cerca de $1,8 \times 10^8$ nucleotídeos de comprimento. Que fração do genoma é mostrada na micrografia?

Figura 6-9 As forquilhas de replicação se movem em direções opostas, a partir de diversas origens de replicação nos cromossomos eucarióticos. A micrografia eletrônica mostra o DNA sendo replicado no embrião precoce de mosca. As partículas visíveis ao longo do DNA são os nucleossomos, estruturas formadas por DNA e complexos proteicos, sobre os quais o DNA é enrolado (ver Capítulo 5). (1), (2) e (3) são desenhos da mesma região de uma molécula de DNA, vistas em estágios sucessivos de replicação, desenhados a partir de micrografias eletrônicas. (2) é desenhado a partir da micrografia mostrada na figura. As linhas em *laranja* representam as fitas de DNA originais; as linhas *vermelhas* contínuas representam DNA recém-sintetizado. (Micrografia eletrônica cortesia de Victoria Foe.)

Figura 6-10 **O DNA é sintetizado na direção 5′-3′.** A adição de um desoxirribonucleotídeo à extremidade 3′-OH de uma cadeia polinucleotídica é a reação fundamental para a síntese de DNA; a nova cadeia de DNA é, portanto, sintetizada na direção 5′-3′. Os nucleotídeos entram na reação como trifosfatos de nucleosídeos. O pareamento de bases entre o desoxirribonucleotídeo a ser incorporado e a fita-molde direciona a formação de uma nova fita complementar, em sequência de nucleotídeos, à cadeia molde (ver Figura 6-2). A enzima DNA-polimerase catalisa a adição de nucleotídeos à extremidade 3′-OH livre na cadeia crescente de DNA. A quebra de uma ligação anidridofosfórica (indicada por um *asterisco*) no trifosfato de nucleosídeo a ser incorporado libera uma grande quantidade de energia livre, fornecendo energia para a reação de polimerização.

A DNA-polimerase acopla a liberação dessa energia à reação de polimerização. O pirofosfato é ainda hidrolisado a fosfato inorgânico (P_i), tornando a reação de polimerização irreversível (ver Figura 3-41).

A DNA-polimerase não se dissocia do DNA cada vez que adiciona um novo nucleotídeo na cadeia crescente; ao contrário, permanece associada ao DNA e se desloca, a cada etapa, sobre a fita-molde por vários ciclos da reação de polimerização. A **Animação 6.1** mostra uma molécula de DNA-polimerase em ação. Veremos mais adiante, neste capítulo, que uma proteína especial mantém a polimerase acoplada ao DNA à medida que essa adiciona repetidamente novos nucleotídeos à cadeia crescente.

A forquilha de replicação é assimétrica

A direção 5′-3′ do mecanismo de polimerização do DNA impõe um problema para a forquilha de replicação. Vimos, na Figura 5-2, que o esqueleto de açúcar-fosfato de cada fita da dupla-hélice de DNA possui uma única direção química, ou polaridade, determinada pelo modo como um resíduo de açúcar está ligado a outro, e que as duas fitas da dupla-hélice possuem orientações opostas. Como consequência, na forquilha de replicação, uma fita nova de DNA é sintetizada sobre um molde com uma orientação (3′-5′), e outra é sintetizada sobre um molde com orientação oposta (5′-3′) (**Figura 6-11**). Portanto, a forquilha de replicação é assimétrica. À primeira vista, ambas as fitas novas de

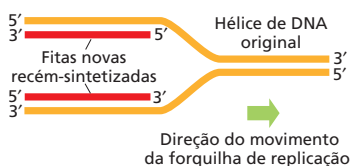



Figura 6-11 Na forquilha de replicação, as duas fitas de DNA recém-sintetizadas possuem polaridades opostas.

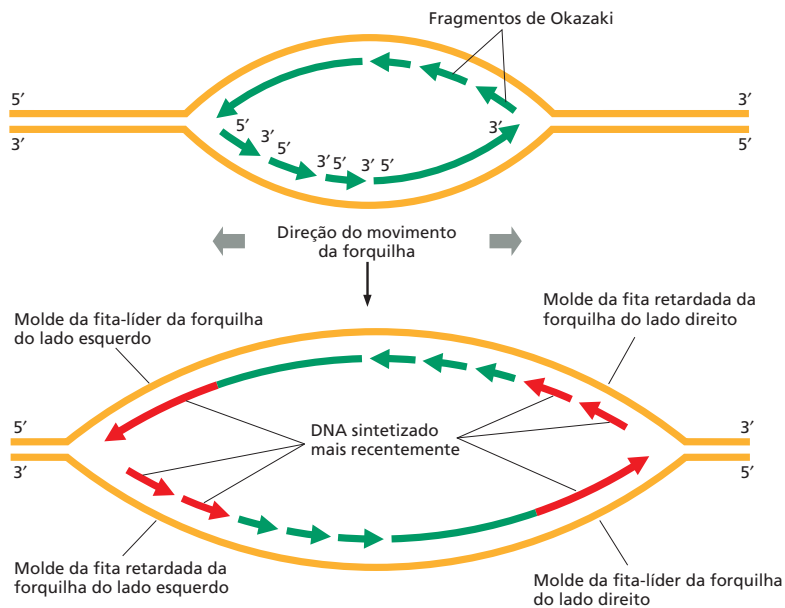



Figura 6-12 As forquilhas de replicação de DNA são assimétricas. Como ambas as fitas novas são sintetizadas na direção 5′-3′, a fita retardada de DNA deve ser feita, inicialmente, como uma série de pequenos fragmentos de DNA que serão unidos mais tarde. O diagrama superior mostra duas forquilhas de replicação movendo-se em direções opostas; o diagrama inferior mostra as mesmas forquilhas de replicação um pouco mais tarde. Para sintetizar a fita retardada, a DNA-polimerase deve "costurar para trás": ela sintetiza fragmentos curtos (chamados de fragmentos de Okazaki) na direção 5′-3′, e a seguir se move na direção oposta pela fita-molde (em direção à forquilha) antes de sintetizar o próximo fragmento.

DNA parecem crescer na mesma direção, isto é, na direção do movimento da forquilha. Isso sugere que uma fita é sintetizada na direção 3′-5′, e a outra é sintetizada na direção 5′-3′.

A DNA-polimerase, entretanto, pode catalisar o crescimento da cadeia de DNA em uma única direção; a adição de novas subunidades só pode ocorrer na extremidade 3′ da cadeia (ver Figura 6-10). Assim, uma fita nova de DNA só pode ser sintetizada na direção 5′-3′. Isso pode ser facilmente entendido para a síntese de uma das fitas na forquilha de replicação, mas não para outra. Poderia ser esperado que um segundo tipo de DNA-polimerase realizasse a síntese da outra fita de DNA – uma polimerase capaz de adicionar subunidades à extremidade 5′ da cadeia. Entretanto, tal enzima não existe. Em vez disso, o problema é resolvido por uma manobra de "costurar para trás". A fita de DNA cuja extremidade 5′ deve crescer é produzida de modo *descontínuo*, em pequenos segmentos sucessivos, na qual a DNA-polimerase polimeriza para trás em relação ao movimento da forquilha, na direção 5′-3′ em cada novo segmento.

Esses pequenos segmentos de DNA – chamados de **fragmentos de Okazaki**, em homenagem ao cientista que os descobriu – são unidos mais tarde, formando uma fita nova contínua (Figura 6-12). A fita de DNA sintetizada de modo descontínuo é chamada de **fita retardada**; a outra fita, sintetizada de modo contínuo, é chamada de **fita-líder**.

Embora sejam diferentes em alguns detalhes, as forquilhas de replicação de todas as células, procarióticas e eucarióticas, possuem fitas-líder e retardada. Essa característica é comum porque todas as DNA-polimerases utilizadas na replicação do DNA polimerizam apenas na direção 5′-3′. Uma vantagem importante dessa manobra molecular aparentemente complicada é discutida a seguir.

A DNA-polimerase é autocorretiva

A DNA-polimerase é tão precisa que produz apenas cerca de um erro a cada 10^7 pares de nucleotídeos copiados. Essa taxa de erro é muito menor do que pode ser explicado simplesmente pela precisão do pareamento entre bases complementares. A -T e C-G são, de longe, os pares de bases mais estáveis, mas outros pares, menos estáveis – como G-T e C-A, por exemplo – podem ser formados. Esses pareamentos incorretos são formados com muito menos frequência com-

Figura 6-13 **Durante a síntese de DNA, a DNA-polimerase verifica seu próprio trabalho.** Se um nucleotídeo incorreto é adicionado a uma fita crescente, a DNA-polimerase irá removê-lo e substituí-lo pelo nucleotídeo correto antes de continuar a síntese.

parados aos corretos, mas, se permanecessem no DNA, matariam a célula pelo acúmulo de mutações. Essa catástrofe é evitada porque a DNA-polimerase possui duas características que aumentam enormemente a precisão da replicação do DNA. Primeiro, a enzima monitora cuidadosamente o pareamento de bases entre cada nucleotídeo a ser incorporado e a fita-molde. A DNA-polimerase catalisa a reação de adição apenas quando o pareamento está correto. Segundo, quando a DNA-polimerase produz um erro raro e adiciona um nucleotídeo incorreto, ela pode verificar o erro por uma atividade chamada de **correção de erros** (*proofreading*).

A correção de erros ocorre ao mesmo tempo em que a síntese de DNA. Antes de adicionar um próximo nucleotídeo à cadeia crescente de DNA, a enzima verifica se o nucleotídeo inserido anteriormente está pareado de forma correta à fita-molde. Se estiver, a polimerase adiciona o próximo nucleotídeo; se não, a polimerase remove o nucleotídeo malpareado e tenta novamente (Figura 6-13). Portanto, a DNA-polimerase possui uma atividade de polimerização 5′-3′ altamente precisa e também uma atividade de correção de erros 3′-5′. Essa correção é realizada por uma nuclease que cliva o esqueleto fosfodiéster. A polimerização e a correção de erros são fortemente coordenadas, e ambas as reações são realizadas por diferentes domínios da molécula da polimerase (**Figura 6-14**).

Esse mecanismo de correção explica por que a DNA-polimerase sintetiza DNA apenas na direção 5′-3′, apesar de esse modo impor um mecanismo complicado de costura para trás na forquilha de replicação. Como mostrado na **Figura 6-15A**, uma DNA-polimerase hipotética que sintetizasse na direção 3′-5′ (e assim não necessitaria "costurar para trás") seria incapaz de autocorreção; caso um nucleotídeo incorretamente pareado fosse removido, a polimerase criaria uma extremidade de cadeia quimicamente morta, no sentido de perder sua capacidade de alongamento. Portanto, para que uma DNA-polimerase funcione como uma enzima autocorretiva, que remove seus próprios erros de polimerização à medida que se desloca pelo DNA, ela deve polimerizar apenas na direção de 5′-3′ (Figura 6-15B).

Pequenos segmentos de RNA atuam como iniciadores na síntese de DNA

Vimos que a fidelidade da replicação do DNA depende da necessidade de haver uma extremidade corretamente pareada para a DNA-polimerase, antes que ela possa adicionar novos nucleotídeos. No entanto, como a polimerase somente pode ligar um nucleotídeo a um nucleotídeo pareado na dupla-hélice de DNA, ela não pode iniciar uma fita de DNA completamente nova.

Figura 6-14 **A DNA-polimerase contém sítios separados para síntese e correção do DNA.** O diagrama se baseia na estrutura da molécula de DNA-polimerase de *E. coli*, determinada por cristalografia por raios X. De certa forma, a enzima se assemelha a uma mão direita, que segura o DNA com a palma, dedos e polegar. A DNA-polimerase é mostrada com o DNA-molde, no modo de polimerização (*à esquerda*) e no modo de correção (*à direita*). Os sítios catalíticos para a atividade de polimerização (P) e correção de erros (E) estão indicados. Quando um nucleotídeo incorreto é adicionado, o DNA recém-sintetizado (*em vermelho*) temporariamente se afasta do molde (*em laranja*), e a polimerase sofre uma alteração conformacional (indicada por uma seta *em cinza*) que coloca o sítio de correção de erros na posição para permitir a remoção do nucleotídeo recém-adicionado.

Figura 6-15 **A necessidade de correção explica por que as cadeias de DNA são sintetizadas apenas na direção 5′-3′.** (A) No modelo hipotético de polimerização na direção 3′-5′, o mecanismo de correção permitiria a remoção de um nucleotídeo incorreto (em *verde-escuro*), mas bloquearia a adição do nucleotídeo correto (em *vermelho*), portanto impedindo o alongamento da cadeia. (B) O crescimento na direção 5′-3′ permite que a cadeia seja continuamente alongada quando um nucleotídeo incorreto for adicionado e removido pelo mecanismo de correção (ver Figura 6-14).

Uma enzima diferente é necessária – uma capaz de começar uma nova cadeia polinucleotídica simplesmente pela junção de dois nucleotídeos sem a necessidade de uma extremidade pareada. Contudo, essa enzima não é capaz de sintetizar DNA. Ela produz pequenos segmentos de um tipo de ácido nucleico intimamente relacionado – **RNA (ácido ribonucleico)** – usando a fita de DNA como molde. Esse pequeno segmento de RNA, com cerca de 10 nucleotídeos, é pareado à fita-molde e fornece a extremidade 3′ pareada como ponto de início para a DNA-polimerase. Portanto, atua como um *iniciador* (*primer*) para a síntese de DNA, e a enzima que sintetiza o iniciador de RNA é denominada *primase*.

A primase é um exemplo de *RNA-polimerase*, uma enzima que sintetiza RNA utilizando DNA como molde. Uma fita de RNA é muito semelhante quimicamente a uma fita única de DNA, com a exceção de ser formada por subunidades de ribonucleotídeos, na qual o açúcar é a ribose, e não a desoxirribose; o RNA também difere do DNA por conter a base uracila (U), em vez da timina (T) (ver Painel 2-6, p. 74-75). Entretanto, como U pode formar um par de bases com A, o iniciador de RNA é sintetizado na fita de DNA por complementaridade de pares de bases exatamente da mesma forma que o DNA.

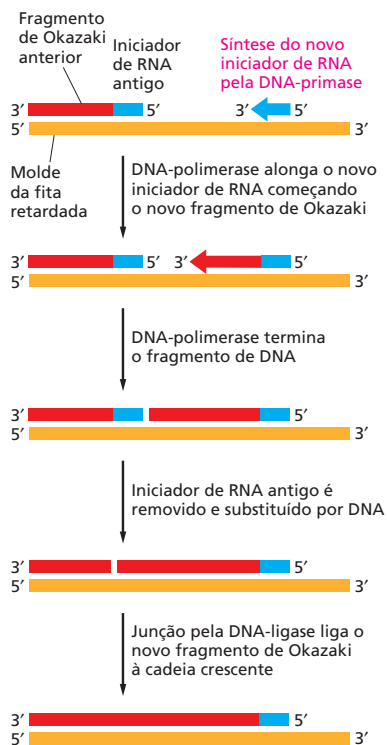



Figura 6-16 **Na fita retardada, o DNA é sintetizado em fragmentos.** Em eucariotos, os iniciadores de RNA são adicionados em intervalos de cerca de 200 nucleotídeos na fita retardada, e cada iniciador de RNA possui aproximadamente 10 nucleotídeos. Na bactéria *E. coli*, os iniciadores e fragmentos de Okazaki possuem cerca de 5 e 1.000 nucleotídeos, respectivamente. Os iniciadores são removidos por nucleases que reconhecem uma fita de RNA na hélice RNA/DNA e degradados, resultando em lacunas que são preenchidas por uma DNA-polimerase de reparo, com atividade de correção à medida que preenche o intervalo. Os fragmentos completados são, finalmente, unidos por uma enzima chamada DNA-ligase, que catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster entre a extremidade 3′–OH de um fragmento e a extremidade 5′-fosfato do próximo, ligando seus esqueletos de açúcar-fosfato. Essa ligação necessita da energia na forma de ATP ou NADH.

Na fita-líder, apenas um iniciador de RNA é necessário para começar a replicação na origem de replicação; uma vez que a forquilha de replicação tenha se estabelecido, uma extremidade 3′ pareada é continuamente apresentada à DNA-polimerase à medida que se desloca pela fita-molde. Todavia, na fita retardada, onde a síntese de DNA é descontínua, novos iniciadores são continuamente necessários (ver Figura 6-12). À medida que o movimento da forquilha de replicação expõe um novo segmento de bases não pareadas, um novo iniciador de RNA é produzido em intervalos na fita retardada. A DNA-polimerase adiciona um desoxirribonucleotídeo à extremidade 3′ desse iniciador para começar uma fita de DNA, e irá continuar a alongar essa fita até encontrar o próximo iniciador de RNA (**Figura 6-16**).

Para produzir uma fita nova contínua de DNA a partir dos vários segmentos de ácidos nucleicos produzidos na fita retardada, três enzimas adicionais são necessárias. Essas atuam rapidamente para remover o iniciador de RNA, substituí-lo por DNA e unir os fragmentos de DNA. Portanto, uma nuclease degrada o iniciador de RNA, uma DNA-polimerase chamada de *polimerase de reparo* substitui o RNA por DNA (usando as extremidades dos fragmentos de Okazaki adjacentes como iniciadores), e a enzima *DNA-ligase* une a extremidade de 5′- fosfato de um fragmento novo de DNA à extremidade 3′–OH do próximo (ver Figura 6-16).

A primase pode iniciar novas cadeias polinucleotídicas, mas essa atividade só é possível porque a enzima não verifica seu trabalho. Como resultado, os iniciadores possuem uma alta frequência de erros. Como são feitos de RNA em vez de DNA, eles são como "cópias suspeitas" para serem automaticamente removidos e substituídos por DNA. Esse DNA é adicionado por enzimas de reparo de DNA, que, bem como as polimerases replicativas, verificam o pareamento à medida que sintetizam DNA. Dessa forma, a maquinaria de replicação das células é capaz de iniciar novas cadeias de DNA e, ao mesmo tempo, assegurar que todo o DNA tenha sido fielmente copiado.

QUESTÃO 6-2

Discuta a seguinte afirmação: "A primase é uma enzima imprecisa que comete vários erros. Ao final do processo, os iniciadores de RNA que ela sintetiza são removidos e substituídos por DNA, sintetizados por uma polimerase de alta fidelidade. Isso é um desperdício. Se a DNA-polimerase fizesse uma cópia precisa já no início, o processo seria mais eficiente energeticamente."

As proteínas se associam na forquilha de replicação, formando uma máquina de replicação

Como mencionado, a replicação do DNA requer uma série de proteínas que atuam em concerto. Aqui, discutiremos as proteínas que, juntamente com a DNA-polimerase e a primase, formam uma máquina proteica que empurra a forquilha de replicação para frente e sintetiza o DNA novo atrás dela.

Para que a síntese de DNA possa ocorrer, a dupla-hélice deve estar aberta à frente da forquilha de replicação, de modo que os trifosfatos de desoxirribonucleosídeo possam ser pareados com a fita-molde. Dois tipos de proteínas de replicação – DNA-helicases e proteína ligadora de fitas simples – se associam para realizar essa tarefa. Bem à frente da máquina de replicação está a *helicase*, uma proteína que utiliza energia da hidrólise do ATP para separar a dupla-hélice à medida que se desloca sobre o DNA (**Figura 6-17A** e **Animação 6.2**). A *proteína ligadora de fita simples* se liga ao DNA de fita simples exposto pela helicase, evitando temporariamente o repareamento de bases e mantendo a fita alongada para que possa atuar como molde para a DNA-polimerase.

Figura 6-17 A síntese de DNA é realizada por um grupo de proteínas que atuam em conjunto como uma maquinaria de replicação. (A) Duas moléculas de DNA-polimerase são mostradas, uma na fita-líder e uma na fita retardada. Ambas são mantidas no DNA por uma proteína circular, um grampo, que permite que a polimerase deslize sobre o DNA. Um montador do grampo (não mostrado) é necessário para religar o grampo deslizante no molde da fita retardada, cada vez que um fragmento de Okazaki é iniciado. Na "cabeça" da forquilha, uma DNA-helicase utiliza energia da hidrólise do ATP para impulsionar-se para a frente, separando as fitas da dupla-hélice de DNA original. Proteínas de ligação à fita simples mantêm essas fitas separadas na forma de fitas simples, para permitir o acesso da primase e da polimerase. Para simplificar, essa figura mostra as enzimas funcionando independentemente; na célula, elas estão unidas formando uma máquina de replicação, como mostrado em (B). (B) Esse diagrama mostra um modelo atual de como as proteínas da replicação estão dispostas na forquilha de replicação quando em movimento. A estrutura em (A) foi alterada pelo dobramento do DNA sobre a fita retardada para aproximar a molécula de DNA-polimerase da fita retardada da molécula de polimerase da fita-líder. Esse dobramento também aproxima a extremidade 3' de cada fragmento de Okazaki completo do local de início do próximo fragmento de Okazaki. Como a molécula de DNA-polimerase da fita retardada é mantida pelo restante das proteínas de replicação, ela pode ser reutilizada na síntese de fragmentos de Okazaki sucessivos; nesse diagrama, ela está prestes a completar um fragmento de DNA, dissociar-se desse e deslocar-se até o iniciador de RNA que será sintetizado a seguir na fita retardada. Para assistir ao complexo de replicação em movimento, ver **Animação 6.5**.

Uma proteína adicional da replicação, chamada de *grampo deslizante*, mantém a DNA-polimerase firmemente ligada ao DNA-molde enquanto sintetiza novas fitas de DNA. Se atuassem sozinhas, a maioria das moléculas de DNA-polimerase sintetizaria apenas pequenos segmentos de nucleotídeos e então se desligariam da fita-molde de DNA. O grampo deslizante forma um anel ao redor da hélice de DNA e, como está fortemente ligado à polimerase, permite que essa se desloque sobre a fita-molde sem se desligar, à medida que sintetiza o DNA novo (ver Figura 6-17A e **Animação 6.3**).

A montagem desse grampo em volta do DNA necessita da atividade de uma proteína adicional de replicação, o *montador do grampo*, que hidrolisa ATP cada vez que prende um grampo ao redor da hélice de DNA. Essa montagem deve ocorrer apenas uma vez por ciclo de replicação na fita-líder; na fita retardada, porém, o grampo é removido e recolocado cada vez que um novo fragmento de Okazaki é produzido.

A maioria das proteínas envolvidas na replicação do DNA é mantida unida em um grande complexo multienzimático que se desloca sobre o DNA como uma unidade, permitindo que ele seja sintetizado de modo coordenado nas duas fitas. Esse complexo pode ser comparado a uma pequena máquina de costura composta por partes proteicas e impulsionada pela hidrólise de trifosfatos de nucleosídeo (**Animação 6.4**). Embora as estruturas dos componentes proteicos individuais da máquina de replicação tenham sido determinadas, o modo como esses componentes atuam em concerto não é conhecido em detalhes.

Contudo, algumas ideias a respeito do aspecto geral do complexo foram propostas (Figura 6-17B).

A telomerase replica as extremidades dos cromossomos eucarióticos

QUESTÃO 6-3

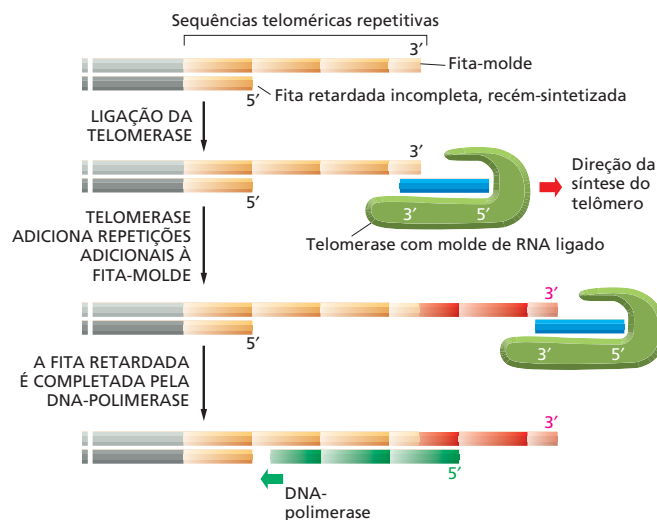
Um gene que codifica uma das proteínas envolvidas na replicação do DNA foi inativado por uma mutação em uma célula. Na ausência dessa proteína, a célula tenta replicar o DNA pela última vez. Que produtos de DNA seriam formados se cada uma das seguintes proteínas estivesse ausente?

A. DNA-polimerase
B. DNA-ligase
C. Grampo deslizante da DNA-polimerase
D. A nuclease que remove os iniciadores de RNA
E. DNA-helicase
F. Primase

Após discutirmos como a replicação do DNA inicia nas origens e como o movimento da forquilha de replicação avança, discutiremos agora um problema especial de replicação das extremidades dos cromossomos. Como apresentado anteriormente, o fato de o DNA ser sintetizado apenas na direção 5′-3′ implica que a fita retardada da forquilha de replicação seja sintetizada como fragmentos descontínuos de DNA, cada um iniciado por um iniciador de RNA adicionado por uma enzima separada (ver Figura 6-16). Quando a forquilha de replicação se aproxima da extremidade de um cromossomo, a máquina de replicação encontra um grave problema: não há como colocar o iniciador de RNA necessário para iniciar um fragmento de Okazaki na extremidade de uma molécula de DNA linear. Se não houvesse uma estratégia para tratar esse problema, uma parte de DNA seria inevitavelmente perdida nas extremidades de uma molécula de DNA cada vez que ela fosse replicada.

As bactérias resolveram o problema do "final de replicação" possuindo uma molécula circular de DNA como cromossomo. Os eucariotos resolveram esse problema possuindo sequências nucleotídicas especiais nas extremidades cromossômicas incorporadas nos *telômeros*. Essas sequências de DNA telomérico atraem uma enzima chamada de **telomerase** ao cromossomo. Usando um molde de RNA que é parte da própria enzima, a telomerase recoloca os nucleotídeos perdidos cada vez que um cromossomo é duplicado, adicionando inúmeras cópias da mesma sequência de DNA às extremidades cromossômicas. Essa sequência alongada de DNA repetido atua como molde, permitindo que a replicação da fita retardada seja completada pela replicação convencional (**Figura 6-18**).

Além de permitir a replicação das extremidades cromossômicas, os telômeros realizam funções adicionais: por exemplo, as sequências repetidas do DNA telomérico, juntamente com as regiões cromossômicas adjacentes, formam estruturas que são reconhecidas pela célula como extremidades verdadeiras dos cromossomos; portanto, diferentes de quebras que ocorrem acidentalmente na porção medial dos cromossomos. Essas quebras devem ser imediatamente reparadas, como veremos a seguir.

Figura 6-18 **Os telômeros permitem que a síntese de DNA nas extremidades dos cromossomos eucarióticos seja completada.** Para sintetizar a fita retardada na extremidade de um cromossomo eucariótico, a maquinaria de replicação necessita de uma porção de DNA-molde que se estenda além do DNA a ser copiado. Em uma molécula de DNA linear, a síntese da fita retardada, portanto, para um pouco antes do final do molde. A enzima telomerase adiciona uma série de repetições de uma sequência de DNA à extremidade 3′ da fita-molde, que então permite que a fita retardada seja completada pela DNA-polimerase como mostrado. Em humanos, a sequência nucleotídica da repetição telomérica é GGGGTTA. A enzima telomerase contém um pequeno segmento de RNA (em *azul*) com sequência complementar à sequência de repetição de DNA; esse RNA atua como molde para a síntese de DNA pela telomerase. Para assistir à telomerase em ação, ver **Animação 6.6**.

REPARO DE DNA

A diversidade dos organismos vivos e o seu sucesso na colonização de quase todas as partes da superfície da Terra resultaram de alterações genéticas acumuladas gradativamente por milhões de anos. Essas alterações permitiram a adaptação de organismos às novas condições e a colonização de novos hábitats. Contudo, em períodos curtos, e do ponto de vista de um organismo individual, as alterações genéticas podem ser prejudiciais – especialmente em organismos multicelulares, nos quais uma alteração pode perturbar o desenvolvimento e a fisiologia de um organismo extremamente complexo e afinado. Para sobreviver e se reproduzir, um indivíduo deve ser geneticamente estável. Essa estabilidade é alcançada não apenas pelo mecanismo extremamente preciso durante a replicação do DNA, discutido anteriormente, mas também pela atuação de uma variedade de máquinas proteicas que verificam o genoma à procura de lesões e as corrigem. De fato, a maioria dessas lesões no DNA é temporária, sendo imediatamente corrigidas por processos denominados coletivamente **reparo de DNA**.

As mutações podem originar consequências graves em uma célula ou organismo

Muito raramente, os processos celulares de replicação de DNA e reparo falham, permitindo uma alteração permanente no DNA. Tais alterações permanentes são chamadas de **mutações** e podem ter consequências severas. Uma mutação que afeta apenas um único par de nucleotídeos pode comprometer seriamente a saúde do organismo se a alteração ocorrer em uma posição vital na sequência de DNA. Como a estrutura e a atividade de cada proteína dependem da sua sequência de aminoácidos, uma proteína com uma sequência alterada pode ter sua função comprometida ou anulada. Por exemplo, os humanos utilizam a proteína hemoglobina para transportar oxigênio no sangue (ver Figura 4-20). Uma alteração permanente em um único nucleotídeo nessa sequência pode provocar a produção de uma hemoglobina com uma sequência de aminoácidos incorreta. Uma dessas mutações resulta na doença *anemia falciforme* (**Figura 6-19**). A hemoglobina falciforme é menos solúvel do que a hemoglobina normal e forma precipitados fibrosos, que originam a forma de foice, característica dos eritrócitos afetados. Como essas células são mais frágeis e frequentemente arrebentam na corrente sanguínea, os pacientes com essa doença potencialmente fatal possuem um número reduzido de eritrócitos do que o normal (Figura 6-19C), uma deficiência que pode provocar fraqueza, tonturas, dores de cabeça, dores e falência total de órgãos.

O exemplo da anemia falciforme, que é uma doença hereditária, ilustra a importância de proteger as células reprodutivas (*células germinativas*) contra mutações. Uma mutação em uma dessas células será transmitida a todas as cé-

Figura 6-19 Uma única alteração nucleotídica provoca a doença anemia falciforme. (A) A β-globina é um dos dois tipos de subunidades que forma a hemoglobina (ver Figura 4-20). Uma única alteração nucleotídica (mutação) no gene da β-globina produz uma subunidade de β-globina que difere da β-globina normal somente pela alteração de um ácido glutâmico para valina na sexta posição de aminoácido. (Apenas uma pequena porção do gene é mostrada; a subunidade de β-globina tem 146 aminoácidos.) Humanos contêm duas cópias de cada gene (uma herdada de cada progenitor); a mutação da anemia falciforme em um dos dois genes da β-globina geralmente não apresenta prejuízos ao indivíduo, porque é compensada pelo gene normal. Entretanto, um indivíduo que herda as duas cópias do gene mutante da β-globina apresenta os sintomas da anemia falciforme. Eritrócitos normais são mostrados em (B), e eritrócitos de um indivíduo com anemia falciforme em (C). Embora a anemia falciforme seja uma doença potencialmente fatal, a mutação responsável pode também ser benéfica: pacientes com a doença, ou portadores heterozigotos para a mutação, são mais resistentes à malária, comparados a indivíduos normais, porque o parasita que causa malária cresce com dificuldade nos eritrócitos que contêm a forma falciforme na hemoglobina.

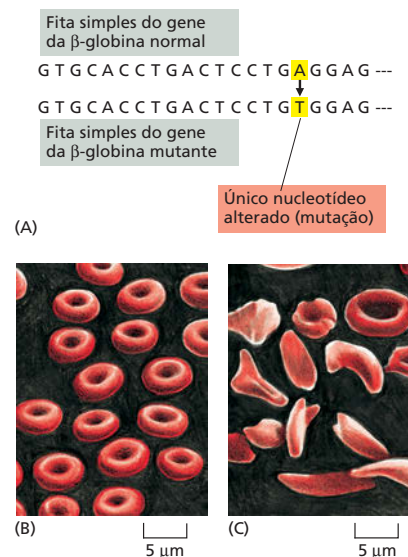
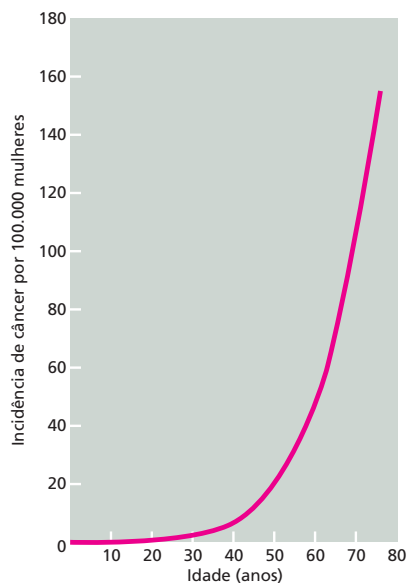



Figura 6-20 **A incidência de câncer aumenta drasticamente com o aumento da idade.** O número de novos casos diagnosticados de câncer de cólon em mulheres na Inglaterra e no País de Gales em um ano foi avaliado em função da idade no momento do diagnóstico. O câncer de cólon é causado pelo acúmulo de várias mutações. Como as células sofrem alterações acidentais no seu DNA continuamente, e essas são transmitidas à progênie dessas células, a chance de uma célula tornar-se cancerosa aumenta enormemente com a idade. (Dados de C. Muir *et al.*, Cancer Incidence in Five Continents, Vol. V. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987.)

lulas do corpo de um organismo multicelular que se desenvolve a partir dessa célula germinativa alterada, incluindo as células germinativas que produzirão a próxima geração.

As tantas outras células de um organismo multicelular (suas *células somáticas*) devem ser protegidas de alterações genéticas que surgem durante a vida do indivíduo. As alterações nucleotídicas que ocorrem nas células somáticas podem originar células variantes, algumas capazes de crescer e de dividir de modo descontrolado à custa de outras células do organismo. Em um caso extremo, temos como resultado uma proliferação celular descontrolada conhecida como câncer. Essa doença, responsável por cerca de 30% das mortes na Europa e na América do Norte, resulta, em grande parte, do acúmulo gradual de alterações nas sequências de DNA de células somáticas causadas por mutações aleatórias (**Figura 6-20**). Um aumento da frequência de mutações de duas ou três vezes provocaria uma elevação desastrosa na incidência de câncer pela aceleração da taxa de surgimento de variantes das células somáticas.

Portanto, a alta fidelidade com a qual as sequências de DNA são replicadas e mantidas é importante tanto para as células reprodutivas, que transmitem os genes para a próxima geração, como para as células somáticas, que normalmente atuam como componentes cuidadosamente regulados de uma complexa comunidade celular em um organismo multicelular. Não é de surpreender, portanto, que todas as células tenham adquirido um sofisticado conjunto de mecanismos para reduzir o número de mutações que ocorrem em seu DNA.

Um sistema de reparo, do malpareamento de DNA, remove erros de replicação que escapam da maquinaria de replicação

Na primeira parte deste capítulo, vimos que a alta fidelidade da maquinaria de replicação celular geralmente previne erros durante a cópia do DNA. Contudo, apesar desses mecanismos, os erros ocorrem. Felizmente, a célula possui um sistema de segurança – chamado de *reparo de malpareamento de DNA* – dedicado à correção desses erros raros. A máquina de replicação por si insere um nucleotídeo incorreto a cada 10^7 nucleotídeos copiados, e o sistema de reparo de malpareamento corrige 99% desses erros, aumentando a precisão de correção total para um erro a cada 10^9 nucleotídeos copiados. Esse nível de precisão é muito mais alto se comparado aos encontrados no mundo visível à nossa volta (**Tabela 6-1**).

Sempre que a máquina de replicação comete um erro de cópia, ela deixa o nucleotídeo malpareado (normalmente chamado de *malpareamento*) para trás. Se deixado sem correção, o malpareamento irá resultar em uma mutação permanente no próximo ciclo de replicação (**Figura 6-21A**). Um conjunto de proteínas de reparo de malpareamento reconhece esses malpareamentos no DNA, remove uma das duas fitas de DNA envolvidas no malpareamento e sintetiza novamente a fita perdida (**Figura 6-22**). Para ser eficiente na correção dos erros de replicação, o sistema de reparo de malpareamento deve sempre remover apenas a fita de

TABELA 6-1 Taxas de erro

Entrega com hora marcada do Serviço Postal dos EUA de correspondência local (primeira classe)	13 entregas atrasadas a cada 100
Sistema de bagagem de companhias aéreas	1 bagagem perdida a cada 200
Digitadora profissional que digita 120 palavras por minuto	1 erro a cada 250 caracteres
Dirigir um carro nos Estados Unidos	1 morte em cada 10^4 pessoas por ano
Replicação do DNA (sem reparo de malpareamento)	1 erro em cada 10^7 nucleotídeos copiados
Replicação do DNA (incluindo reparo de malpareamento)	1 erro em cada 10^9 nucleotídeos copiados

Figura 6-21 Erros originados durante a replicação do DNA devem ser corrigidos para evitar mutações. (A) Se não corrigido, o malpareamento irá causar uma mutação permanente em uma das duas moléculas de DNA produzidas no próximo ciclo de replicação. (B) Se o malpareamento for "corrigido" usando a fita recém-sintetizada como molde, ambas as moléculas produzidas no próximo ciclo de replicação irão conter a mutação. (C) Se o malpareamento for corrigido usando a fita-molde original (antiga) como molde, a mutação é eliminada. O esquema mostrado em (C) é usado pelas células no reparo de malpareamento, como mostrado na Figura 6-22.

DNA recém-sintetizada: a remoção da outra fita (fita original) iria perpetuar o erro, em vez de corrigi-lo (ver Figura 6-21B e C).

Em eucariotos, não se sabe ao certo como a maquinaria de reparo de malpareamento distingue as duas fitas de DNA. No entanto, há evidências de que as novas fitas de DNA recém-replicadas – tanto a líder como a retardada – são clivadas preferencialmente, e parece que essas quebras (quebras de fita simples) fornecem o sinal que direciona o sistema de reparo de malpareamento à fita adequada (ver Figura 6-22).

O reparo de malpareamento apresenta uma função particularmente importante na prevenção do câncer. Uma predisposição hereditária a determinados cânceres (em especial, alguns tipos de câncer de colo) é provocada por uma mutação em genes que codificam proteínas de reparo de malpareamento. Os indivíduos herdam duas cópias desse gene (uma de cada progenitor), e indivíduos que herdam um gene de reparo de malpareamento alterado não apresentam sintomas até que a cópia do gene normal sofra uma mutação acidental em uma célula somática. Quando essa célula mutante sofre divisão, origina um conjunto de células somáticas que, sendo deficientes no reparo de malpareamento, acumula mutações muito mais rapidamente em comparação a células normais. Como a maioria dos cânceres se desenvolve a partir de células com múltiplas mutações (ver Figura 6-20), uma célula deficiente no reparo de malpareamento possui uma chance muito aumentada de tornar-se cancerosa. Portanto, a herança de um gene mutante para o reparo de malpareamento predispõe um indivíduo a desenvolver câncer.

O DNA está continuamente sofrendo danos nas células

Como foi visto, os raros erros na replicação de DNA são corrigidos pelo mecanismo de reparo de malpareamento. Entretanto, o DNA pode ser danificado de várias outras maneiras, e essas requerem outros mecanismos para serem reparadas.

Assim como qualquer outra molécula na célula, o DNA está constantemente sofrendo colisões térmicas com outras moléculas. Essas frequentemente resultam nas principais alterações químicas no DNA. Por exemplo, durante o

Figura 6-22 Proteínas de reparo de malpareamento corrigem erros que ocorrem durante a replicação de DNA. Um malpareamento de DNA, formado quando uma base incorreta é incorporada à cadeia de DNA recém-sintetizada, distorce a geometria da dupla-hélice. Essa distorção é logo reconhecida pelas proteínas de reparo de malpareamento, que removem o DNA recém-sintetizado. O intervalo nessa fita é preenchido por uma DNA-polimerase que verifica à medida que sintetiza a fita e é selado pela DNA-ligase. Como mostrado na figura, foi proposto que uma quebra no DNA atua como um sinal que permite a distinção das fitas recém-sintetizada (que contêm o erro) e da fita original pelas proteínas de reparo. Essas quebras ocorrem na fita retardada (ver Figura 6-12) e também ocorrem, embora menos frequentemente, na fita líder. Essas quebras permanecem apenas por um curto intervalo de tempo, após a passagem da forquilha de replicação (ver Figura 6-16), de modo que o reparo de malpareamento deve acontecer rapidamente.

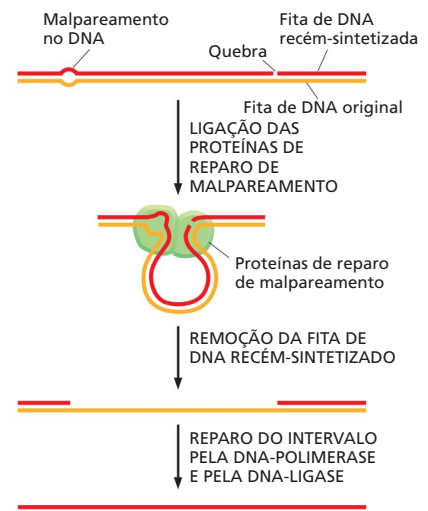
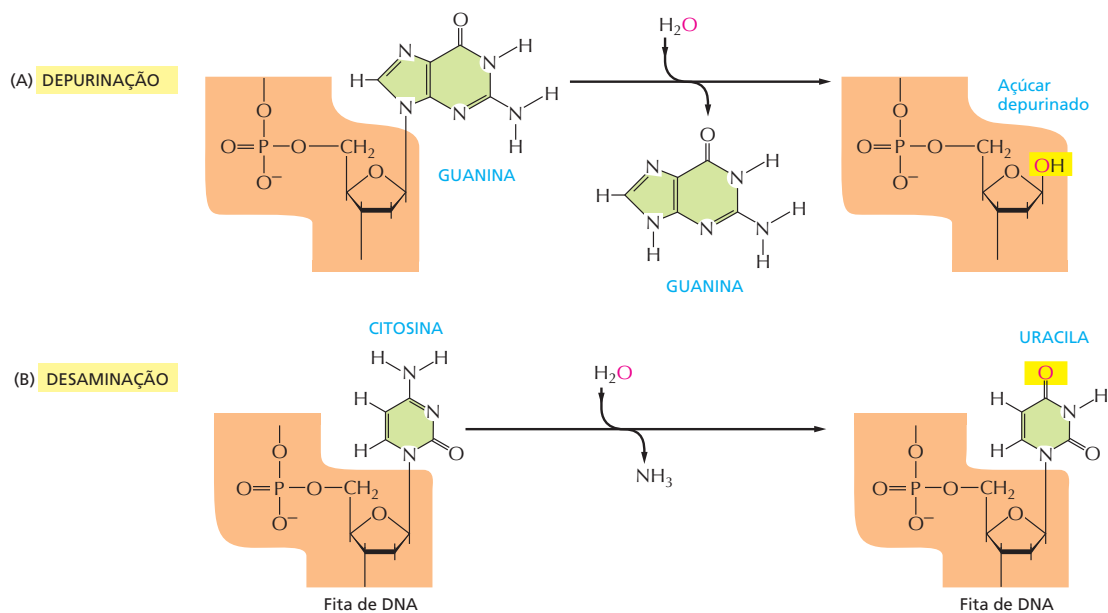



Figura 6-23 A depurinação e a desaminação são as reações químicas conhecidas mais frequentes que provocam danos graves ao DNA nas células. (A) A depurinação remove a guanina e a adenina do DNA. (B) O principal tipo de reação de desaminação converte a citosina em uma base alterada do DNA, a uracila, mas também pode ocorrer em outras bases. Ambas as reações ocorrem na dupla-hélice de DNA, mas em nenhuma há quebra do esqueleto fosfodiéster (destacado em *laranja*); por conveniência, apenas uma fita de DNA é mostrada.

tempo gasto para ler essa sentença, um total de aproximadamente um trilhão (10^{12}) de bases púricas (A e G) serão perdidas do DNA das células do seu corpo, por uma reação espontânea chamada de *depurinação* (**Figura 6-23**). A depurinação não causa quebras no esqueleto de açúcar-fosfato, mas produz lesões que se assemelham a um "dente perdido". Uma outra alteração comum é a perda espontânea de um grupo amino (*desaminação*) de uma citosina no DNA produzindo a base uracila (ver Figura 6- 23). Alguns subprodutos quimicamente reativos do metabolismo também reagem, ocasionalmente, com as bases do DNA, alterando-as de forma que suas propriedades de pareamento são modificadas. A radiação ultravioleta da luz solar também danifica o DNA; ela promove a formação de uma ligação covalente entre duas bases pirimídicas adjacentes, formando, por exemplo, os *dímeros de timina*, mostrados na **Figura 6-24**.

Essas são apenas algumas das várias alterações químicas que ocorrem no nosso DNA. Se não corrigidas, muitas delas resultariam na substituição de um

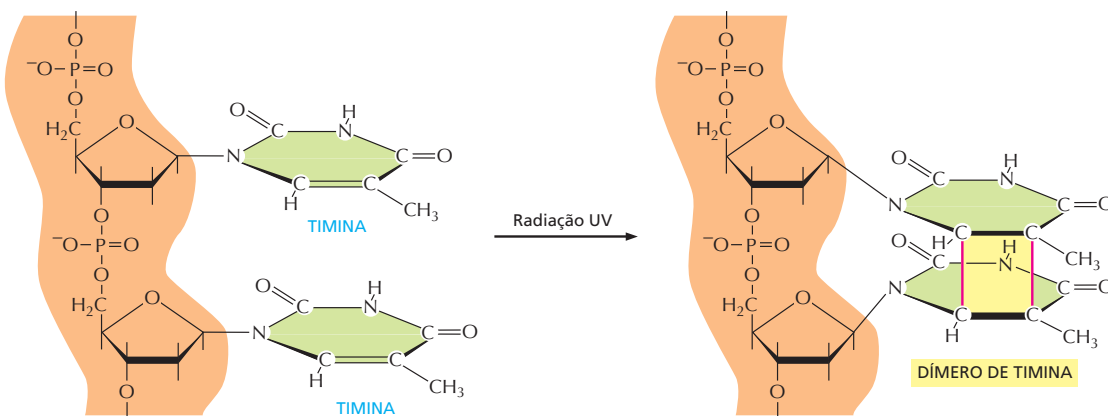



Figura 6-24 A radiação ultravioleta da luz solar provoca lesão no DNA. Duas bases timina adjacentes foram ligadas covalentemente entre si, formando um dímero de timina. As células da pele expostas à luz do sol são especialmente suscetíveis a esse tipo de lesão de DNA.

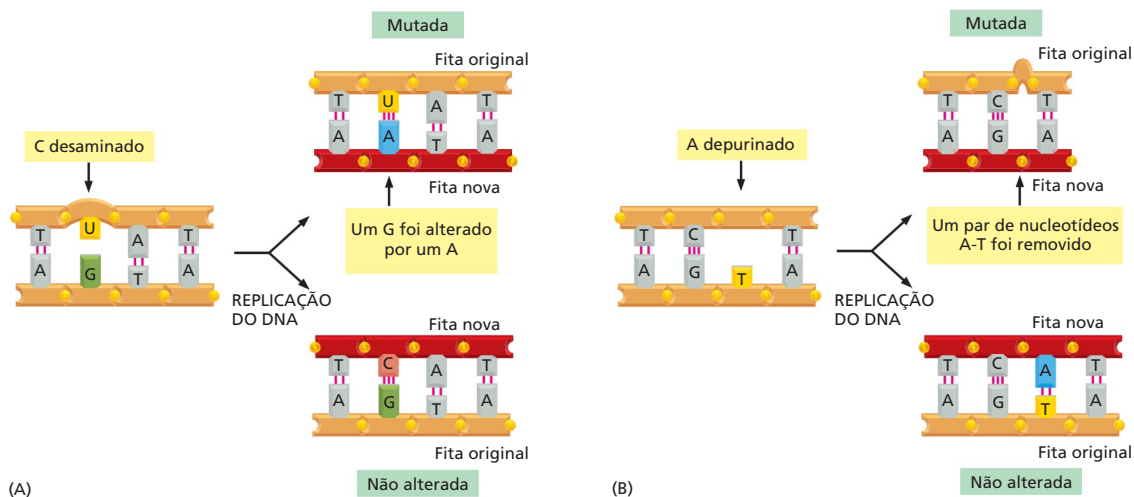



Figura 6-25 **Modificações químicas de nucleotídeos, se não corrigidas, produzem mutações.** (A) A desaminação da citosina, se não corrigida, resulta na substituição de uma base por outra quando o DNA é replicado. Como mostrado na Figura 6-23, a desaminação da citosina produz uracila. A uracila difere da citosina nas propriedades de pareamento, pareando-se preferencialmente com a adenina. A máquina de replicação de DNA, portanto, insere uma adenina quando encontra uma uracila na fita-molde. (B) A depurinação, se não corrigida, provoca a perda de um par de nucleotídeos. Quando a máquina de replicação encontra uma purina ausente na fita-molde, ela pula para o próximo nucleotídeo completo, como mostrado; portanto, produz uma deleção de nucleotídeos na fita recém-sintetizada. Em outros casos (não mostrado), a maquinaria de replicação adiciona um nucleotídeo incorreto transversal à base ausente, novamente resultando em mutação.

par de nucleotídeos por outro, pelo pareamento incorreto durante a replicação, ou na deleção de um ou mais pares de nucleotídeos na fita-filha de DNA após a replicação (Figura 6-25). Alguns tipos de lesões no DNA (p. ex., dímeros de timina) normalmente param a maquinaria de replicação de DNA no local da lesão. Todos esses tipos de danos, se não corrigidos, trariam consequências desastrosas a um organismo.

QUESTÃO 6-4

Discuta a seguinte afirmação: "As enzimas de reparo de DNA que corrigem lesões de desaminação e depurinação devem reconhecer, preferencialmente, essas lesões em fitas de DNA recém-sintetizadas."

A estabilidade dos genes depende do reparo de DNA

Os milhares de alterações químicas aleatórias que ocorrem todos os dias no DNA de uma célula humana, devidas aos acidentes metabólicos ou à exposição a compostos químicos que danificam o DNA, são corrigidas por uma série de mecanismos, cada um catalisado por um grupo diferente de enzimas. Quase todos esses mecanismos dependem da existência de duas cópias da informação genética, uma em cada fita da dupla-hélice de DNA: se a sequência em uma das fitas for acidentalmente danificada, a informação não é totalmente perdida, porque uma versão da fita alterada permanece na sequência complementar de nucleotídeos na outra fita. A maioria das lesões produz estruturas que não são encontradas em uma fita de DNA não danificada; portanto, a fita correta pode ser facilmente distinguida da fita danificada.

O mecanismo básico para o reparo de danos no DNA está ilustrado na Figura 6-26. Como indicado, ele envolve três etapas:

1. O DNA danificado é reconhecido e removido por um de vários mecanismos diferentes. Esses mecanismos envolvem nucleases, que clivam as ligações covalentes que unem os nucleotídeos danificados ao resto da molécula de DNA, deixando um pequeno intervalo, ou lacuna, em uma das fitas da dupla-hélice de DNA nessa região.
2. Uma DNA-polimerase de reparo se liga à extremidade 3'-OH da fita de DNA clivada. A seguir, ela preenche a lacuna, sintetizando uma cópia complementar da informação contida na fita não danificada. Embora seja uma

Figura 6-26 O mecanismo básico de reparo de DNA envolve três etapas: excisão, ressíntese e ligação. Na etapa 1 (excisão), a lesão é removida por uma de várias nucleases, cada uma especializada em um tipo de lesão no DNA. Na etapa 2 (ressíntese), a sequência de DNA original é restaurada pela DNA-polimerase de reparo, que preenche o intervalo produzido pela excisão. Na etapa 3 (ligação), a DNA-ligase sela a quebra existente no esqueleto de açúcar-fosfato da fita corrigida. A religação, que necessita da energia da hidrólise de ATP, restaura as ligações fosfodiéster entre nucleotídeos adjacentes. Alguns tipos de lesões no DNA (p, ex., a desaminação da citosina [Figura 6-23]) envolvem a substituição de um único nucleotídeo, como mostrado na figura. No reparo de outros tipos de lesões no DNA, como dímeros de timina (ver Figura 6-24), um segmento mais longo com 10 a 20 nucleotídeos é removido da fita danificada.

enzima DNA-polimerase diferente da polimerase que atua na replicação do DNA, a polimerase de reparo sintetiza fitas de DNA da mesma forma. Por exemplo, ela sintetiza cadeias na direção 5′-3′ e possui o mesmo tipo de mecanismo de correção para assegurar que a fita-molde seja fielmente copiada. Em muitas células, essa é a mesma enzima que preenche a lacuna deixada após a remoção dos iniciadores de RNA durante o processo normal de replicação (ver Figura 6-16).

3. Quando a DNA-polimerase de reparo completou a lacuna, uma quebra permanece no esqueleto de açúcar-fosfato da fita corrigida. Essa quebra na hélice é selada pela DNA-ligase, a mesma enzima que une os fragmentos de DNA na fita retardada durante a replicação de DNA.

As etapas 2 e 3 são praticamente as mesmas para a maioria dos tipos de reparo de DNA, incluindo o reparo de malpareamento. No entanto, a etapa 1 emprega uma série de enzimas diferentes, cada uma especializada na remoção de um tipo diferente de lesão no DNA.

A importância desses processos de reparo é indicada pelo grande investimento das células na produção das enzimas de reparo. Organismos unicelulares, como as leveduras, contêm mais de 50 proteínas diferentes que atuam no reparo de DNA, e as vias de reparo são ainda mais complexas em humanos. A importância dos processos de reparo de DNA também é evidenciada pelas consequências de seu mau funcionamento. Indivíduos com a doença genética *xeroderma pigmentoso*, por exemplo, são incapazes de reparar dímeros de timina (ver Figura 6-24), porque herdaram um gene defeituoso que codifica uma das proteínas desse processo de reparo. Esses indivíduos desenvolvem lesões graves na pele, incluindo câncer de pele, em virtude do acúmulo de dímeros de timina nas células que são expostas à luz solar e às consequentes mutações que surgem nessas células.

As quebras na fita dupla podem ser corrigidas rapidamente, mas com imperfeição

Um tipo de lesão no DNA especialmente perigoso ocorre quando as duas fitas da dupla-hélice são clivadas, não havendo uma fita intacta para guiar a correção. Radiação ionizante, acidentes na forquilha de replicação, agentes oxidantes fortes e metabólitos produzidos na célula podem causar tais quebras. Se deixadas sem correção, elas produziriam a rápida fragmentação dos cromossomos e causariam a perda de genes no momento na divisão celular.

Diversos mecanismos foram desenvolvidos para corrigir esse tipo de lesão potencialmente desastrosa. Nas células somáticas humanas, o modo mais comum do reparo de quebras de fita dupla é um mecanismo conhecido como **junção de extremidades não homólogas**. Nesse processo, as duas extremidades quebradas são simplesmente aproximadas por um grupo de enzimas especializa-

Figura 6-27 As células podem utilizar a junção de extremidades não homólogas para corrigir quebras da fita dupla. Esse mecanismo rápido, mas imperfeito, altera a sequência original de DNA durante o processo de reparo. Normalmente, as alterações são pequenas deleções.

das e religadas pela ligação de DNA. Embora esse mecanismo conserte a quebra, normalmente há perda de nucleotídeos no local do reparo (**Figura 6-27**). Como apenas uma pequena porção dos genomas de mamíferos contém informação relevante, esse mecanismo "rápido e sujo" parece ser uma solução aceitável para o problema do reparo de quebras cromossômicas.

As células possuem também uma estratégia alternativa, livre de erros para consertar as quebras cromossômicas, especialmente as que ocorrem no DNA recém-replicado. Esse mecanismo, chamado de *recombinação homóloga*, é discutido a seguir na próxima seção deste capítulo.

Um registro da fidelidade da replicação e do reparo do DNA é conservado nas sequências genômicas

Vimos neste capítulo como as sequências de DNA são replicadas e preservadas com uma fidelidade notável. Como resultado, as alterações no DNA se acumulam lentamente durante o curso da evolução. A seleção natural também atua: embora a maioria das mutações não seja nem prejudicial nem benéfica ao organismo, aquelas que produzem consequências prejudiciais são normalmente eliminadas da população pela morte ou fertilidade reduzida de indivíduos que contêm o DNA alterado. Mesmo onde a seleção não atua – nos vários sítios do DNA em que a alteração de um nucleotídeo não possui efeito na capacidade do organismo –, a mensagem genética é fielmente preservada por dezenas de milhões de anos. Assim, humanos e chimpanzés, após cerca de 5 milhões de anos de divergência evolutiva, ainda possuem sequências de DNA com 98% de identidade. Mesmo humanos e baleias, após 10 ou 20 vezes esse período, ainda possuem cromossomos com sequências de DNA similares e diversas proteínas com sequências de aminoácidos quase idênticas (**Figura 6-28**). Portanto, em nossos genomas, nós e nossos parentes recebemos uma mensagem de um passado muito distante. Graças à fidelidade da replicação e reparo de DNA, 100 milhões de anos resultaram em poucas mudanças no seu conteúdo essencial.

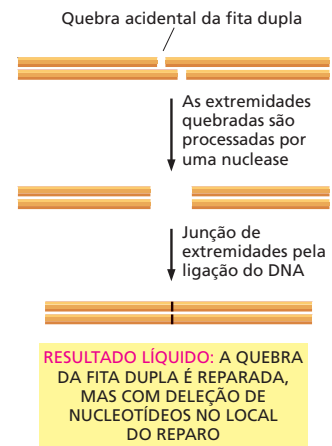



Figura 6-28 Os genes de determinação do sexo em humanos e baleias são, sem dúvida, muito semelhantes. Apesar de os seus planos corporais serem bastante diferentes, homens e baleias são formados a partir das mesmas proteínas. Mesmo com tempo de divergência entre eles, as sequências nucleotídicas de vários dos seus genes são ainda muito semelhantes. As sequências de parte do gene que codifica a proteína que determina a masculinidade em humanos e em baleias estão alinhadas uma sobre a outra, e as posições em que as duas são idênticas estão *sombreadas*.

RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

Até aqui, discutimos como os mecanismos de replicação e reparo de DNA mantêm as sequências de nucleotídeos nas células de geração à geração com muito poucas alterações. Como enfatizamos, esses mecanismos são possíveis graças à redundância inerente da dupla-hélice de DNA, na qual cada fita forma pares de bases com uma segunda fita de sequência complementar. Se os nucleotídeos de uma fita forem danificados, eles podem ser corrigidos usando a informação contida na fita complementar.

Entretanto, o que ocorre à informação genética quando ambos os membros de um par nucleotídico são danificados simultaneamente – por exemplo, quando a fita dupla sofre uma quebra? Como vimos, uma estratégia para corrigir o dano é o uso da junção de extremidades não homólogas para rapidamente consertar a lesão. Contudo, esse mecanismo normalmente sacrifica a informação contida no local da lesão. Uma solução mais elegante é utilizar a informação genética fornecida por um conjunto totalmente separado da dupla-hélice para corrigir a quebra com precisão. Essa estratégia é realizada por um conjunto de reações chamadas coletivamente de **recombinação homóloga**. A característica principal é a troca de informação genética entre um par de moléculas de DNA homólogas: isto é, hélices duplas de DNA com sequência nucleotídica similar ou idêntica. Nesse processo, a informação presente em uma dupla-hélice intacta e não danificada é utilizada como molde para reparar com precisão uma dupla-hélice de DNA quebrada.

Além de atuar no reparo, a recombinação homóloga é também responsável pela geração da diversidade genética durante a *meiose*, uma forma especializada de divisão celular na qual os organismos com reprodução sexuada produzem células germinativas. Nesse caso, a recombinação homóloga troca, fisicamente, informação genética entre os cromossomos maternos e paternos homólogos, produzindo cromossomos com sequências de DNA novas. O benefício evolutivo em potencial desse tipo de rearranjo é que ele produz diversas novas combinações de genes, talvez benéficas, que serão transmitidas de um organismo à sua descendência.

O reparo correto de quebras na fita dupla e a troca de informação genética na meiose parecem – à primeira vista – dois processos não relacionados. Contudo, veremos nesta seção que os dois mecanismos são muito similares e que se baseiam em um conjunto de reações e componentes proteicos muito semelhantes.

A recombinação homóloga requer regiões com extensa similaridade de sequência

Seja qual for o resultado, reparo de DNA ou troca de sequências nucleotídicas durante a meiose, a essência da recombinação homóloga é que ela ocorre somente entre dúplices de DNA que contenham regiões com extensa similaridade de sequência (homologia). Um par de moléculas de DNA pode avaliar essa homologia "testando" a sequência nucleotídica uma da outra quando uma fita simples de uma dúplex de DNA inicia uma busca extensiva de pareamento de bases com a fita complementar na outra dúplex. A homologia não precisa ser perfeita para o sucesso da recombinação homóloga, mas perto disso.

A recombinação homóloga pode reparar quebras na fita dupla de DNA sem erros

A recombinação homóloga é normalmente iniciada quando uma quebra de fita dupla ocorre logo após a replicação de um segmento de DNA; no momento, as hélices duplicadas estão ainda bastante próximas entre si (**Figura 6-29A**). Para iniciar o reparo, uma nuclease produz extremidades de fita simples no ponto de quebra, pela degradação de uma das fitas de DNA complementar (Figura

6-29B). Com o auxílio de enzimas especializadas, uma dessas fitas simples então "invade" a dupla-hélice homóloga estabelecendo pares de bases com sua fita complementar. Caso esse teste resulte em um pareamento extenso, um *ponto de ramificação* é criado onde as duas fitas de DNA – uma de cada dúplex – se cruzam (Figura 6-29C). Nesse ponto, a fita invasora é sintetizada por uma DNA-polimerase de reparo, usando a fita complementar como molde (Figura 6-29D). O ponto de ramificação então "migra" à medida que os pares de bases que unem as dúplices são rompidos, e há a formação de novos pares de bases (Figura 6-29E). O reparo é finalizado pela síntese adicional de DNA, seguida pela ligação do DNA (Figura 6-29F). O resultado final consiste em duas hélices de DNA intactas, nas quais a informação genética de uma foi utilizada como molde para corrigir a outra hélice.

A recombinação homóloga pode também corrigir vários outros tipos de lesões no DNA, o que a torna, talvez, o mecanismo de reparo de DNA mais versátil disponível na célula, necessitando apenas de um cromossomo homólogo intac-

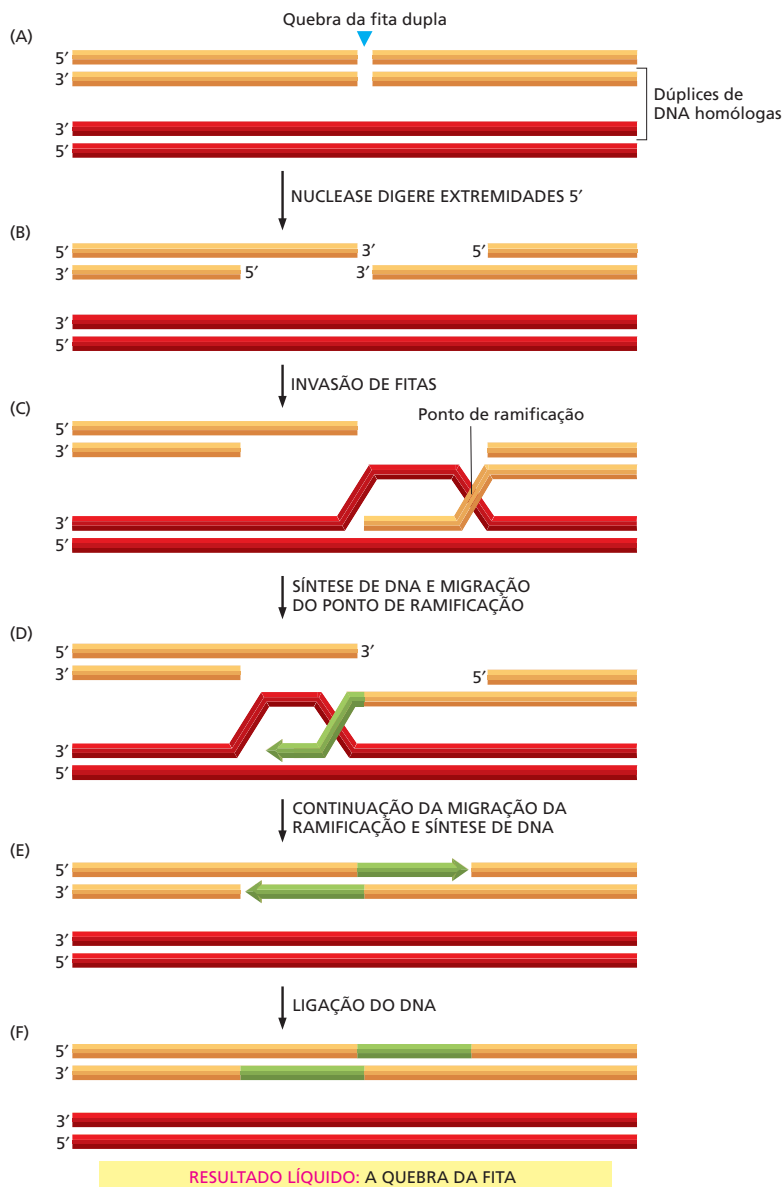



Figura 6-29 A recombinação homóloga permite o reparo correto de quebras da fita dupla. Esse é o método preferido para o reparo de quebras da fita dupla que ocorrem logo após a replicação do DNA, mas antes da divisão celular. (Adaptada de M. McVey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:15694-15699, 2004. Com permissão da Nacional Academy of Sciences.)

to para ser usado como complemento – e cromossomos idênticos como esses, pareados, são produzidos temporariamente cada vez que os cromossomos são replicados. A natureza de "serve para tudo" do reparo por recombinação provavelmente explica por que esse mecanismo e as proteínas que o realizam foram conservados em praticamente todas as células na Terra.

A recombinação homóloga troca informação genética durante a meiose

Organismos com reprodução sexuada dependem do processo de meiose para produzir as células germinativas – óvulos e espermatozoides, no caso dos mamíferos. A recombinação homóloga é essencial para que esse processo ocorra corretamente, como será discutido em detalhes no Capítulo 19. Uma consequência especialmente importante da recombinação homóloga durante a meiose é a formação dos *crossovers* (entrecruzamentos cromossômicos). No *crossover*, dois cromossomos homólogos – um paterno e outro materno – se aproximam e sofrem uma troca genética (**Figura 6-30**). A troca pode ocorrer em qualquer local das sequências nucleotídicas homólogas das duas moléculas de DNA participantes do processo. Os eventos de clivagem e religação que promovem a troca ocorrem tão precisamente que não há perda ou adição de um único nucleotídeo.

Como os cromossomos paterno e materno diferem levemente nas suas sequências, o entrecruzamento origina novas combinações de sequências de DNA em cada cromossomo. Os benefícios dessa mistura de genes nos organismos da progênie são, aparentemente, tão grandes que o rearranjo de genes pela recombinação homóloga não é limitado apenas a organismos de reprodução sexuada; ele também é amplamente distribuído em organismos de reprodução assexuada, por exemplo, quando uma bactéria adquire um cromossomo homólogo de outra célula bacteriana através da *transferência horizontal de genes*, como veremos no Capítulo 9.

A recombinação homóloga durante a meiose inicia com uma ação radical: uma enzima especial cliva, deliberadamente, as duas fitas de um dos cromossomos recombinantes, gerando uma quebra de fita dupla. Nesse momento, algumas das mesmas proteínas que atuam no reparo de quebras de fita dupla convergem para a "lesão". Essas proteínas de recombinação são agora dirigidas por proteínas específicas da meiose para realizarem suas tarefas de modo diferente, produzindo – por meio de um ou mais *crossovers* – duas moléculas com sequências de DNA novas (Figura 6-31). Esse resultado é possível porque, na meiose, a recombinação ocorre preferencialmente entre os cromossomos materno e paterno, em vez de ocorrer entre fitas idênticas de DNA recém-replicadas, como no reparo de quebra de fita dupla mediado pela recombinação homóloga.

Os *crossovers* durante a meiose asseguram que cada um dos nossos cromossomos contenha uma combinação das sequências de DNA dos nossos dois progenitores. Como discutiremos em detalhes no Capítulo 19, esse tipo de rearranjo cromossômico origina uma grande quantidade de diversidade genética na progênie de organismos de reprodução sexuada e contribuiu enormemente para a incrível variedade de formas de vida presentes no planeta.

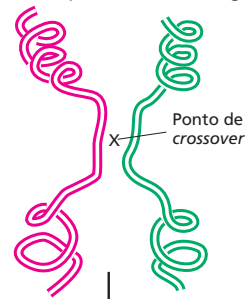



Figura 6-30 A recombinação homóloga ocorre entre moléculas de DNA com sequências nucleotídicas similares. A clivagem e a religação de duas duplas-hélices de DNA homólogas originam duas moléculas de DNA que sofreram *crossover*. Embora as duas moléculas originais tenham sequências semelhantes para poderem sofrer recombinação, elas não são idênticas; portanto, o *crossover* produz moléculas de DNA com sequências novas de nucleotídeos.

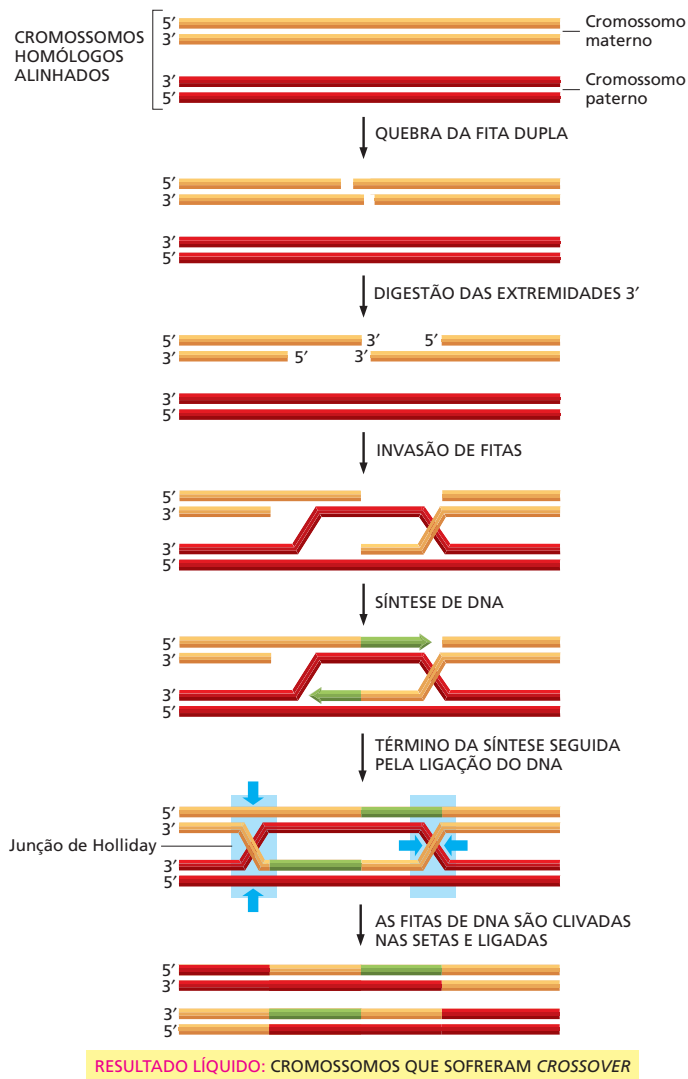



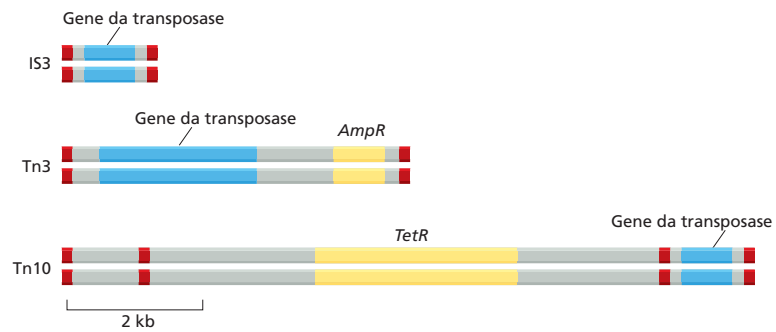
Figura 6-31 A recombinação homóloga na meiose produz *crossovers*. Uma vez que proteínas específicas da meiose tenham clivado a dupla-hélice de DNA e processado as extremidades, a recombinação homóloga ocorre através da formação da junção de Holliday (retângulos em *azul*) – os sítios onde os dúplices de DNA se cruzam, assim chamada em homenagem ao pesquisador que a descobriu. Para olhar essas estruturas ao microscópio eletrônico, ver **Animação 6.7**. Várias dessas etapas que produzem o *crossover* durante a meiose se assemelham às usadas no reparo de fita dupla do DNA (compare com a Figura 6-29).

ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS E VÍRUS

Vimos que a recombinação homóloga pode promover a troca de sequências de DNA entre cromossomos. No entanto, essas trocas são geralmente conservativas: a ordem dos genes no cromossomo recombinante permanece a mesma, porque a recombinação homóloga ocorre apenas entre cromossomos com sequências muito semelhantes.

Contudo, os genomas também estão sujeitos a formas mais severas de variação genética – trocas que alteram a ordem dos genes em um cromossomo ou mesmo a inserção de novas informações. A seguir, veremos essas formas mais radicais de reestruturação genética. Os agentes que promovem essas alterações genéticas drásticas são os **elementos genéticos móveis**, algumas vezes chamados informalmente de genes saltitantes. Encontrados em praticamente todas as células, esses elementos são segmentos de DNA pequenos, especializados, que se movem de um local a outro do genoma da célula. Embora possam inserir-se em qualquer sequência dentro de um mesmo genoma, a maior parte dos elementos genéticos móveis não pode sair da célula na qual reside. Seu movimento, portanto, é limitado a uma única célula e sua descendência.

Figura 6-32 As bactérias contêm vários tipos de transpósons de DNA-only, três deles são mostrados nesta figura. Cada um destes elementos contém um gene que codifica a transposase (em *azul*), uma enzima que catalisa o movimento do elemento móvel. Cada transpóson também contém sequências de DNA (indicadas em *vermelho*) que são reconhecidas apenas pela transposase codificada por aquele elemento e necessárias ao seu deslocamento.

Alguns elementos genéticos móveis contêm, ainda, genes que codificam enzimas que inativam antibióticos, como ampicilina (*AmpR*) e tetraciclina (*TetR*). O movimento desses genes representa um sério problema na medicina, porque diversas bactérias causadoras de doenças se tornaram resistentes a muitos dos antibióticos desenvolvidos durante o século XX.

Esse não é o caso dos *vírus*. Os vírus, compostos essencialmente por uma sucessão de genes envoltos por uma capa protetora, são a forma mais avançada de DNA móvel, uma vez que podem escapar de uma célula e infectar outra. Terminaremos esta seção com uma breve discussão sobre os vírus, os quais, embora ocasionalmente benéficos às células, são responsáveis por algumas das doenças humanas mais devastadoras.

Os elementos genéticos móveis codificam os componentes necessários para o seu movimento

Ao contrário da recombinação homóloga, o movimento dos elementos genéticos não necessita de similaridade entre sequências. Em vez disso, cada tipo de elemento normalmente codifica uma enzima de recombinação especial que promove seu movimento (**Figura 6-32**). Essas enzimas reconhecem e atuam em sequências de DNA únicas, localizadas em cada elemento genético móvel. Vários elementos contêm também outros genes. Por exemplo, os elementos genéticos móveis que possuem genes de resistência a antibióticos contribuíram grandemente para a disseminação de resistência a antibióticos em populações bacterianas.

Os elementos genéticos móveis são também chamados de **transpósons** e são normalmente classificados de acordo com o mecanismo que permite seu movimento ou *transposição*. Em bactérias, os elementos genéticos móveis mais comuns são os transpósons de *DNA-only*. O nome é derivado do fato de que durante seu movimento, o elemento permanece como DNA, em vez de ser convertido a RNA, como ocorre em outros elementos discutidos a seguir. As bactérias contêm vários transpósons diferentes de DNA-only. Alguns transpósons se movem ao sítio-alvo usando um mecanismo simples de corte-e-colagem, no qual os elementos são simplesmente removidos do genoma e inseridos em um sítio diferente; outros transpósons de DNA-only replicam seu DNA antes de inseri-lo no novo sítio cromossômico, deixando uma cópia original intacta na localização anterior (**Figura 6-33**).

O genoma humano é composto por duas famílias principais de sequências transponíveis

É espantoso, mas metade do genoma humano é composto por milhares de cópias de vários elementos genéticos móveis, que formam uma grande parte do nosso DNA. Alguns elementos genéticos móveis se moveram de um lugar para outro no genoma humano usando o mecanismo de corte-e-colagem discutido anteriormente para transpósons bacterianos (ver Figura 6-33A). Entretanto, muitos outros se movem não como DNA, mas por meio de um RNA intermediário. Esses são chamados de **retrotranspósons** e são, até onde se sabe, exclusivos de eucariotos.

Um tipo de retrotranspóson humano abundante, o *elemento L1* (algumas vezes denominado *LINE-1*), é transcrito em RNA pelas RNA-polimerases da célula hospedeira. Uma cópia DNA desse RNA é sintetizada pela enzima **transcriptase**

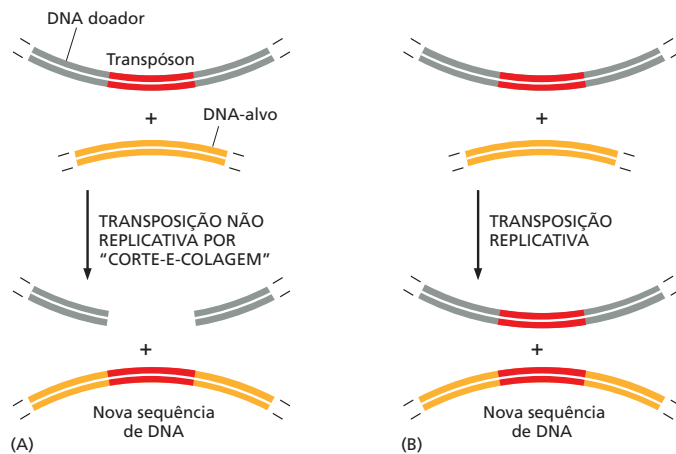



Figura 6-33 Transpósons de DNA-only se movem por dois tipos de mecanismos. (A) Na transposição por corte-e-colagem, o transpóson é clivado do DNA doador e inserido no DNA-alvo, deixando para trás uma molécula de DNA doador clivada. (O doador pode ser reparado de várias maneiras, mas algumas vezes pode resultar em deleções ou rearranjos na molécula doadora.) (B) Na transposição replicativa, o elemento é copiado pela replicação do DNA. Os produtos finais são uma molécula que é idêntica à doadora original e uma molécula-alvo que possui o elemento genético móvel inserido. Em geral, um tipo particular de transpóson se move por apenas um desses dois mecanismos. Entretanto, os dois mecanismos possuem muitas semelhanças enzimáticas, e alguns poucos transpósons podem usar ambos os mecanismos. O DNA do doador e o do alvo podem ser parte de uma mesma molécula de DNA ou pertencerem a moléculas diferentes de DNA.

reversa, uma DNA-polimerase incomum que utiliza RNA como molde. A transcriptase reversa é codificada pelo próprio elemento *L1*. A cópia DNA do elemento pode, então, ser integrada novamente em outro sítio no genoma (**Figura 6-34**).

Os elementos *L1* constituem cerca de 15% do genoma humano. Embora a maior parte das cópias seja imóvel em virtude do acúmulo de mutações deletérias, algumas poucas mantiveram a capacidade de transposição. Seu movimento pode resultar algumas vezes em doenças humanas; por exemplo, há cerca de 40 anos, o movimento de um elemento *L1* no gene que codifica o Fator VIII – uma proteína essencial para a coagulação sanguínea – provocou hemofilia em um indivíduo sem nenhuma história familiar da doença.

Um outro tipo de retrotranspóson, a *sequência Alu*, está presente em cerca de 1 milhão de cópias no nosso genoma. Os *elementos Alu* não codificam sua própria transcriptase reversa e, portanto, dependem de enzimas já presentes na célula para promover seu movimento.

Comparações entre as sequências e a localização dos elementos *L1* e *Alu* presentes em diferentes mamíferos sugerem que essas sequências se multiplicaram nos primatas, em um passado relativamente recente em tempo evolutivo (**Figura 6-35**). Essas sequências altamente abundantes, espalhadas pelo nosso genoma, devem ter exercido efeitos importantes na expressão de muitos dos nossos genes. Seria talvez estarrecedor imaginar quantas das qualidades exclusivamente humanas devemos a esses parasitas genéticos.

Os vírus são elementos genéticos completamente móveis que podem escapar das células

Os **vírus** foram inicialmente identificados como agentes causadores de doenças, que, em virtude do seu tamanho diminuto, passavam através de filtros ultrafinos capazes de reter mesmo as menores células bacterianas. Sabemos agora

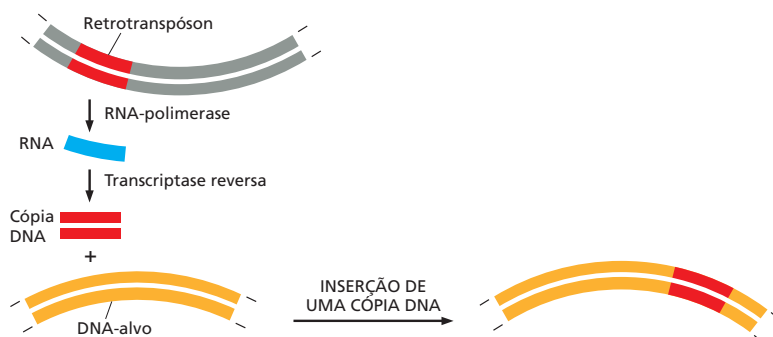
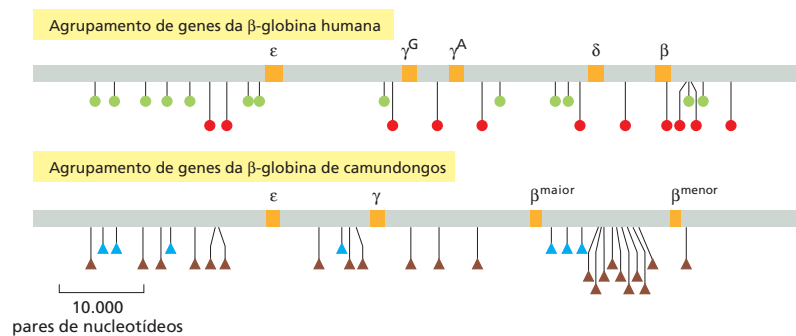



Figura 6-34 Os retrotranspósons se movem através de um RNA intermediário. Esses elementos transponíveis são primeiramente transcritos em um RNA intermediário. Uma cópia DNA desse RNA é produzida pela enzima transcriptase reversa. A seguir, a cópia DNA do transpóson é inserida no sítio-alvo, que pode estar na mesma molécula de DNA ou em outra molécula diferente. O retrotranspóson doador permanece no seu sítio original, de forma que é duplicado cada vez que se transpõe. Esses elementos genéticos móveis são chamados de retrotranspósons porque em uma etapa da sua transposição o fluxo da informação genética é revertido de RNA a DNA.

Figura 6-35 Elementos *L1* e semelhantes a *Alu* se multiplicaram, resultando em um alto número de cópias, recentemente, na escala evolutiva. O genoma humano contém um aglomerado de cinco genes da globina (*parte superior*). Cada gene (mostrados em *laranja* e designados por letras gregas) codifica uma proteína que transporta oxigênio na corrente sanguínea. A região correspondente no genoma de camundongos (*parte inferior*) contém apenas quatro genes da globina. As posições das sequências *Alu* humanas (círculos *verdes*) e os elementos *L1* humanos (círculos *vermelhos*) estão indicados. O genoma de camundongo contém elementos transponíveis diferentes: as posições dos elementos *B1* (relacionados às sequências *Alu* humanas) estão indicadas por triângulos *azuis*, e as posições dos elementos *L1* de camundongos (relacionados à sequência *L1* em humanos) estão indicadas por triângulos *marrons*. Como as sequências de DNA desses elementos em humanos e camundongos são distintas, bem como suas posições nos aglomerados dos genes da globina, acredita-se que eles foram multiplicados em tempo relativamente recente na escala evolutiva. (Cortesia de Ross Hardison e Webb Miller.)

que os vírus são basicamente genes envolvidos por uma capa proteica protetora. Contudo, esses genes devem penetrar em uma célula e utilizar a maquinaria celular para expressar seus genes, formando proteínas, e para replicar seus cromossomos. A reprodução viral é normalmente letal para as células nas quais a replicação ocorre; em muitos casos, a célula infectada se rompe (lisa), liberando a progênie viral e permitindo que infectem as células vizinhas. Muitos dos sintomas da infecção viral refletem o efeito lítico dos vírus. As erupções doloridas formadas pelo vírus herpes simples e as vesículas causadas pelo vírus da varicela, por exemplo, ambas refletem a destruição local das células da pele. Apesar de os primeiros vírus descobertos infectarem células de mamíferos, hoje se sabe que existem diversos tipos de vírus. Alguns também infectam plantas, e outros utilizam bactérias como células hospedeiras.

Os genomas virais podem ser de DNA ou RNA e de fita simples ou fita dupla (Tabela 6-2). A quantidade de DNA ou RNA que pode ser empacotada dentro da capa proteica (capsídeo) é limitada e muito pequena para codificar as diversas enzimas diferentes e outras proteínas necessárias à replicação mesmo de um vírus muito simples. Por essa razão, os vírus devem sequestrar a maquinaria bioquímica da célula para se reproduzirem. Os genomas virais normalmente codificam as proteínas do capsídeo viral e as proteínas que atraem as enzimas do hospedeiro necessárias para replicar seu próprio genoma (Figura 6-36).

TABELA 6-2 Vírus que causam doenças humanas

Vírus	Tipo de genoma	Doença
Vírus herpes simples	DNA de fita dupla	herpes labial
Vírus Epstein-Barr (EBV)	DNA de fita dupla	mononucleose infecciosa
Vírus varicela-zóster	DNA de fita dupla	varicela e herpes-zóster
Vírus da varíola	DNA de fita dupla	varíola
Vírus da hepatite B	Partes de DNA de fita dupla e partes de DNA de fita simples	hepatite sorológica
Vírus da imunodeficiência humana (HIV)	RNA de fita simples	síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS)
Vírus influenza tipo A	RNA de fita simples	doença respiratória (gripe)
Poliovírus	RNA de fita simples	paralisia infantil
Rinovírus	RNA de fita simples	resfriado comum
Vírus da hepatite A	RNA de fita simples	hepatite A
Vírus da hepatite C	RNA de fita simples	hepatite tipo não A, não B
Vírus da febre amarela	RNA de fita simples	febre amarela
Vírus da raiva	RNA de fita simples	raiva
Vírus da caxumba	RNA de fita simples	caxumba
Vírus do sarampo	RNA de fita simples	sarampo

Figura 6-36 **Os vírus comandam a maquinaria da célula hospedeira para se replicarem.** O vírus simples e hipotético, ilustrado aqui, consiste em uma molécula de DNA de fita dupla que codifica um único tipo de proteína do capsídeo viral. Para poder replicar, o genoma viral deve entrar na célula. Essa etapa é seguida pela replicação do DNA viral, formando várias cópias. Ao mesmo tempo, os genes virais são expressos formando a proteína do capsídeo através de etapas sequenciais de *transcrição* e *tradução*, descritas no Capítulo 7. A montagem dos genomas virais com as proteínas do capsídeo viral ocorre espontaneamente, formando novas partículas virais.

O vírus mais simples consiste em uma proteína do capsídeo, formada principalmente por várias cópias de uma única cadeia polipeptídica que envolve um pequeno genoma composto por apenas três genes. Vírus mais complexos possuem genomas maiores, de até centenas de genes, envoltos por uma elaborada capa composta por várias proteínas diferentes (**Figura 6-37**).

Os retrovírus revertem o fluxo normal da informação genética

Embora existam muitas semelhanças entre vírus de bactérias e de eucariotos, uma classe importante de vírus – os **retrovírus** – é encontrada apenas em células eucarióticas. Em vários sentidos, os retrovírus se assemelham aos retrotranspósons discutidos anteriormente. Uma característica-chave comum ao ciclo vital desses dois elementos genéticos é uma etapa na qual o DNA é sintetizado usando RNA como molde. O prefixo *retro* se refere ao reverso do fluxo normal da informação de DNA para RNA (ver Figura 7-2), e a enzima que catalisa essa etapa é a *transcriptase reversa*. O genoma retroviral (que é RNA de fita simples) codifica essa enzima, e algumas moléculas da enzima são empacotadas juntamente com o genoma de RNA em cada partícula viral.

O ciclo vital de um retrovírus é apresentado na Figura 6-38. Quando o genoma de RNA de fita simples do retrovírus entra na célula, a transcriptase re-

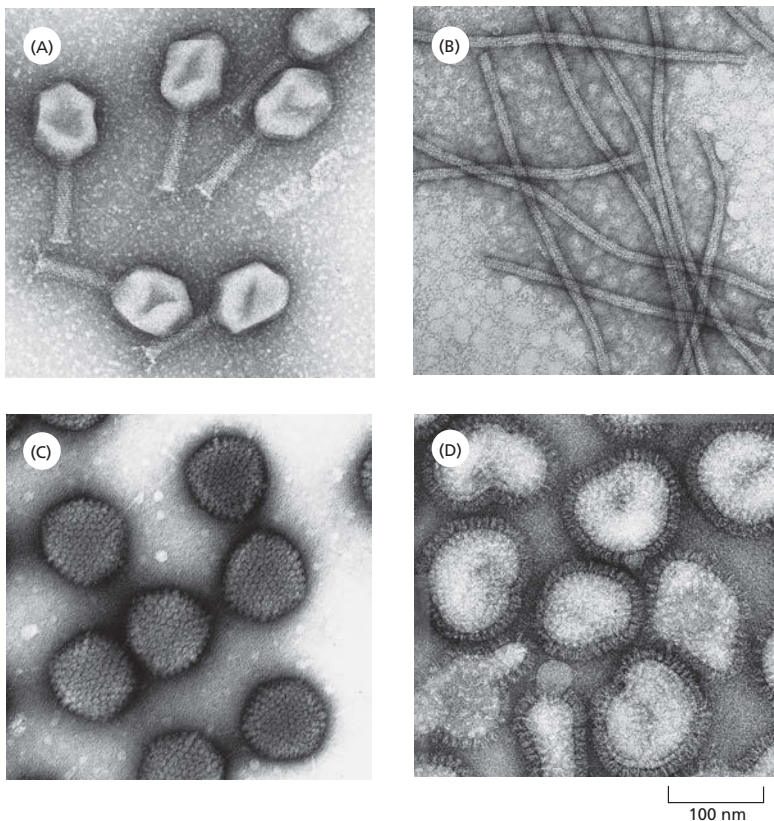
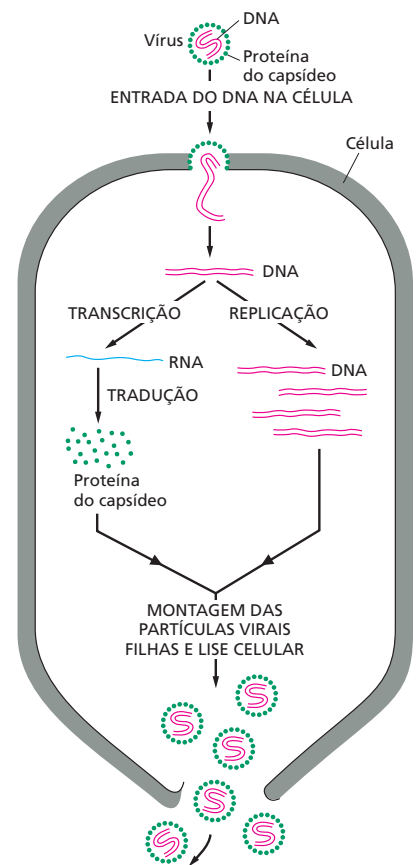



Figura 6-37 **Os vírus existem em diferentes formas e tamanhos.** Essas micrografias eletrônicas de partículas virais são todas mostradas na mesma escala. (A) T4, um grande vírus de DNA que infecta células de *E. coli*. O DNA é armazenado na cabeça do vírus e injetado dentro da bactéria por uma cauda cilíndrica. (B) Vírus X da batata, um vírus de plantas com genoma de RNA. (C) Adenovírus, um vírus de DNA que infecta células humanas. (D) Vírus influenza, um vírus animal grande com genoma de RNA, cujo capsídeo é ainda revestido por um envelope composto por uma bicamada lipídica. As pontas que se projetam para fora do envelope são proteínas virais inseridas na bicamada da membrana (ver Figura 6-38). (A, cortesia de James Paulson; B, cortesia de Graham Hills; C, cortesia de Mei Lie Wong; D, cortesia de R. C. Williams e H. W. Fisher.)

QUESTÃO 6-5

A transcriptase reversa não faz a autocorreção à medida que sintetiza DNA a partir de um RNA-molde. Quais são as consequências disso para o tratamento da AIDS?

versa trazida com ele sintetiza uma fita de DNA complementar formando uma dupla-hélice híbrida RNA/DNA. A fita de RNA é removida, e a transcriptase reversa (que pode utilizar tanto DNA como RNA como molde) agora sintetiza uma fita de DNA complementar produzindo uma dupla-hélice de DNA. A seguir, esse DNA é inserido, ou integrado, em um sítio selecionado aleatoriamente no genoma do hospedeiro, pela enzima *integrase* codificada pelo vírus. Nesse estado, o vírus está latente: cada vez que a célula se dividir, ela transmite uma cópia do genoma viral integrado, conhecido como *provírus*, às células-filhas.

A próxima etapa na replicação de um retrovírus – que pode ocorrer muito tempo após sua integração no genoma hospedeiro – é a cópia, do DNA viral integrado, em RNA por uma enzima RNA-polimerase da célula hospedeira, que produz grandes quantidades de RNA de fita simples idêntico ao seu genoma infectante original. Os genes virais são então expressos pela maquinaria celular do hospedeiro, produzindo as proteínas do capsídeo, do envelope e a transcriptase reversa – todas serão montadas junto com o genoma de RNA, formando novas partículas virais.

O vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV), causador da AIDS, é um retrovírus. Assim como outros retrovírus, o genoma do HIV pode permanecer, por muito tempo no estado latente como um provírus, inserido no cromossomo de uma célula infectada. Essa capacidade do vírus de se "esconder" dentro da célula hospedeira dificulta as tentativas de tratamento com fármacos antivirais. No entanto, como a transcriptase reversa do HIV não é utilizada pelas células para nenhuma de suas funções, essa enzima se tornou um dos principais alvos para o desenvolvimento de medicamentos contra a AIDS.

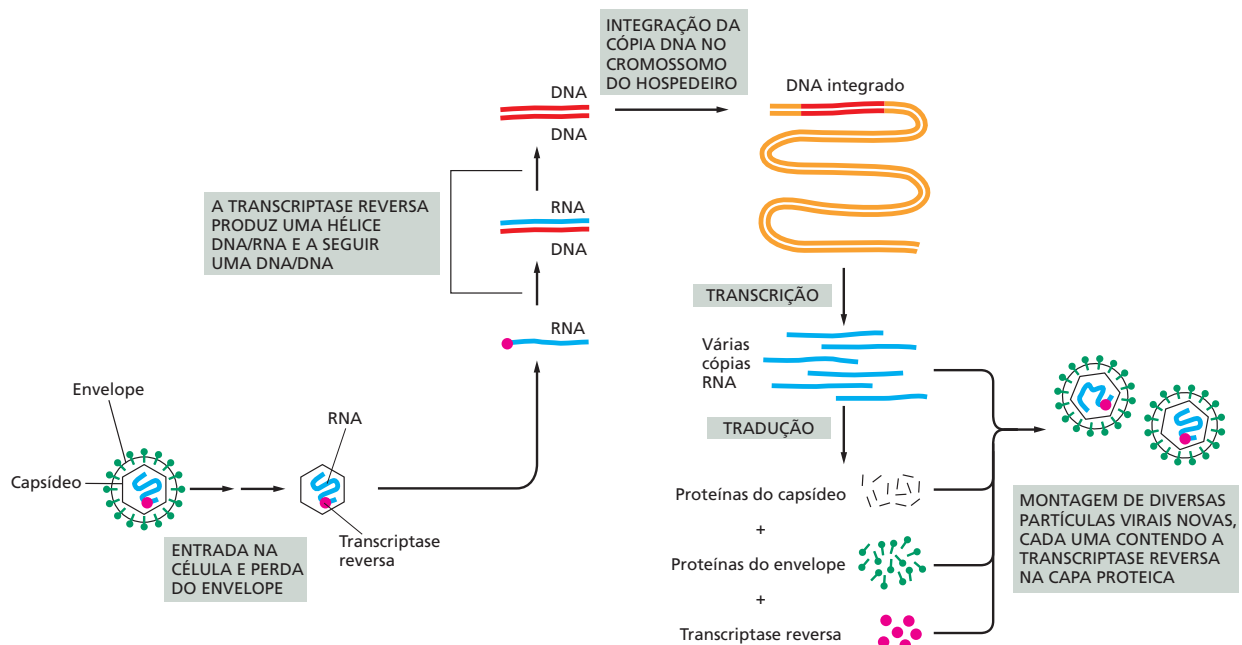



Figura 6-38 **O ciclo vital de um retrovírus inclui transcrição reversa e integração no genoma do hospedeiro.** O genoma do retrovírus consiste em uma molécula de RNA (em *azul*) com cerca de 8.500 nucleotídeos. O genoma está dentro de uma capa proteica envolvida por uma camada lipídica (chamada de envelope) que contém proteínas de envelope codificadas pelo vírus (em *verde*). A enzima transcriptase reversa (círculo em *vermelho*), codificada no genoma viral e empacotada junto com seu RNA, inicialmente produz uma cópia DNA da molécula de RNA viral e depois uma segunda fita de DNA, produzindo uma cópia DNA de fita dupla do genoma de RNA. A integração dessa dupla-hélice de DNA no cromossomo hospedeiro é catalisada pela enzima *integrase* codificada pelo vírus. Essa integração é necessária para a síntese das novas moléculas de RNA viral pela RNA-polimerase da célula hospedeira.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- A capacidade de uma célula manter a ordem em um ambiente caótico depende da duplicação precisa da enorme quantidade de informação genética contida no seu DNA.
- Cada uma das duas fitas de DNA atua como um molde para a síntese da outra fita. Uma dupla-hélice de DNA, portanto, contém a mesma informação em cada uma de suas fitas.
- Uma molécula de DNA é duplicada (replicada) pela polimerização de novas fitas complementares usando cada uma das fitas originais (antigas) da dupla-hélice de DNA como molde. Duas moléculas idênticas de DNA são formadas, permitindo que a informação genética seja copiada e transmitida de uma célula às suas filhas e do progenitor à sua progênie.
- À medida que a molécula de DNA é replicada, suas fitas são afastadas, formando uma ou mais forquilhas de replicação em forma de Y. Enzimas DNA-polimerases, localizadas na forquilha, sintetizam as novas fitas de DNA complementar em cada fita original.
- A DNA-polimerase copia um molde de DNA com uma fidelidade excepcional, cometendo menos de um erro a cada 10^7 bases inseridas. Esse grau de precisão é possível, em parte, em virtude do processo de correção no qual a enzima remove seus próprios erros de polimerização à medida que se desloca pelo DNA.
- Como a DNA-polimerase pode sintetizar o DNA novo apenas em uma direção, somente uma das fitas na forquilha de replicação, a fita-líder, é replicada de modo contínuo. A fita retardada é sintetizada pela DNA-polimerase de modo descontínuo, por um processo de "costura para trás", polimerizando pequenos segmentos de DNA que são, mais tarde, unidos pela enzima DNA-ligase, produzindo uma fita de DNA contínua.
- A DNA-polimerase é incapaz de iniciar uma nova fita de DNA. Então, a síntese de DNA é iniciada por uma RNA-polimerase denominada primase, que sintetiza pequenos segmentos de RNA (iniciadores) que são alongados pela DNA-polimerase. Os iniciadores serão subsequentemente removidos e substituídos por DNA.
- A replicação do DNA requer a cooperação de várias proteínas; essas formam uma máquina multienzimática de replicação que catalisa a síntese de DNA.
- Em eucariotos, uma enzima especial chamada de telomerase replica o DNA nas extremidades cromossômicas.
- Os raros erros de cópia que escapam à máquina de replicação de DNA são corrigidos pelas proteínas de reparo de malpareamento. A precisão global da replicação do DNA, incluindo o reparo de malpareamento, é de um erro a cada 10^9 nucleotídeos copiados.
- Danos no DNA causados por reações químicas inevitáveis são corrigidas por diversas enzimas que reconhecem o DNA danificado e removem um pequeno fragmento da fita de DNA que contém a lesão. O DNA perdido é ressintetizado por uma DNA-polimerase de reparo que utiliza a fita não danificada como molde.
- A junção de extremidades não homólogas permite o reparo rápido de quebras na fita dupla de DNA, e esse processo geralmente altera a sequência de DNA no local do reparo.
- A recombinação homóloga pode corrigir quebras na fita dupla de DNA com precisão usando a sequência de um cromossomo homólogo como guia. Durante a meiose, um processo de recombinação homóloga relacionado promove a mescla de informações genéticas, originando moléculas de DNA com sequências novas.

- **Elementos genéticos móveis, ou transpósons, podem se mover de um lugar a outro no genoma da célula hospedeira, sendo uma fonte de variação genética.**
- **Mais da metade do genoma humano consiste em elementos genéticos móveis. Duas classes desses elementos se multiplicaram em números altíssimos.**
- **Vírus são pouco mais do que alguns genes empacotados em uma capa proteica protetora. Eles necessitam de células hospedeiras para poderem se replicar.**
- **Alguns vírus possuem RNA, em vez de DNA, como genoma. Um grupo de vírus de RNA – os retrovírus – deve copiar seu genoma de RNA em DNA para que possam se replicar.**

TERMOS-CHAVE

DNA-polimerase
reparo do DNA
replicação do DNA
recombinação homóloga
fita-líder
fita retardada
elementos genéticos móveis
mutação
junção de extremidades não homólogas
fragmento de Okazaki
mecanismo de correção
forquilha de replicação
origem de replicação
retrotranspóson
retrovírus
transcriptase reversa
RNA (ácido ribonucleico)
telomerase
molde
transpóson
vírus

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 6-6

As enzimas de reparo de malpareamento do DNA corrigem, preferencialmente, bases em fitas de DNA recém-sintetizadas, usando as fitas originais de DNA como molde. Se os malpareamentos fossem simplesmente corrigidos sem considerar qual fita deve servir como molde, os erros de replicação seriam reduzidos? Explique sua resposta.

QUESTÃO 6-7

Suponha que uma mutação afete uma enzima necessária ao reparo de lesões causadas pela perda de bases púricas. Essa mutação provoca o acúmulo de 5.000 mutações no DNA de cada uma das suas células por dia. Como a diferença média entre as sequências de DNA humano e de chimpanzés é de cerca de 1%, quanto tempo levará para que você se torne um macaco? O que está errado nesse argumento?

QUESTÃO 6-8

Quais das seguintes afirmações estão corretas? Explique sua resposta.

A. Uma forquilha de replicação bacteriana é assimétrica porque contém duas moléculas de DNA-polimerase estruturalmente distintas.

B. Os fragmentos de Okazaki são removidos por uma nuclease que degrada RNA.

C. A taxa de erros da replicação do DNA é reduzida pelo mecanismo de correção da DNA-polimerase e pelo reparo de malpareamento de DNA.

D. Na ausência de reparo de DNA, os genes são instáveis.

E. Nenhuma das bases aberrantes formadas pela desaminação ocorre no DNA naturalmente.

F. O acúmulo de mutações em células somáticas pode resultar em câncer.

QUESTÃO 6-9

A velocidade da replicação do DNA na forquilha é cerca de 100 nucleotídeos por segundo nas células humanas. Qual é o número mínimo de origens de replicação que uma célula humana deve ter para replicar todo seu DNA uma vez a cada 24 horas? Lembre-se de que uma célula humana contém duas cópias do genoma, uma herdada da mãe, e outra do pai, cada uma com 3×10^9 pares de nucleotídeos.

QUESTÃO 6-10

Observe atentamente a estrutura dos compostos mostrados na **Figura Q6-10**. Um ou outro dos dois compostos é adicionado a uma reação de replicação de DNA.

A. O que seria esperado se o composto A fosse adicionado em grande excesso sobre a concentração de trifosfato de didesoxicitosina (dCTP) disponível?

B. O que aconteceria se ele fosse adicionado a 10% da concentração de dCTP disponível?

C. Que efeito seria esperado se o composto B fosse adicionado sob as mesmas condições?

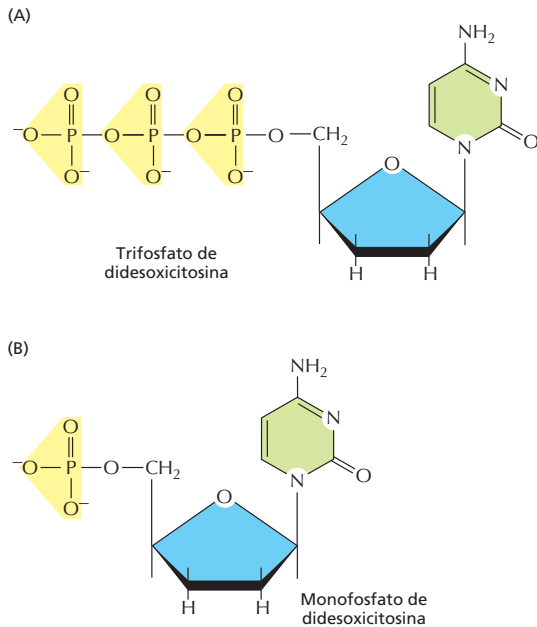



Figura Q6-10

QUESTÃO 6-11

O material genético de um organismo hipotético possui estrutura idêntica ao DNA convencional. Surpreendentemente, as análises revelaram que o DNA é sintetizado a partir de trifosfatos de nucleosídeo que contêm grupos 5′-hidroxila livre e grupos trifosfato na posição 3′. De que forma a DNA-polimerase desse organismo deve diferir das células normais? Ela ainda poderia fazer a autocorreção?

QUESTÃO 6-12

A **Figura Q6-12** mostra um momento da forquilha de replicação no qual o iniciador de RNA foi recém-adicionado à fita retardada. Usando o diagrama como um guia, desenhe o caminho do DNA à medida que o próximo fragmento de Okazaki é sintetizado. Quando necessário, indique o grampo deslizante e a proteína ligadora de fita simples.

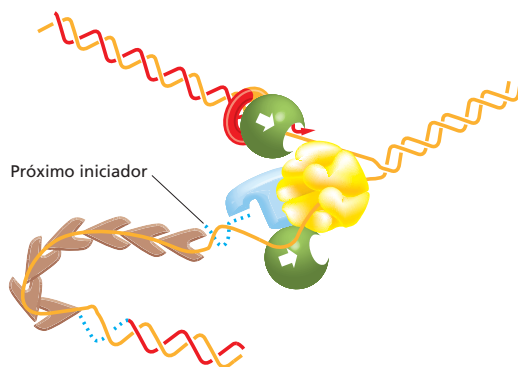



Figura Q6-12

QUESTÃO 6-13

Quantas ligações de alta energia, aproximadamente, são utilizadas para replicar um cromossomo bacteriano? Comparada ao seu peso seco de 10^{-12}g, quantos gramas de glicose uma única bactéria necessita para fornecer energia suficiente para copiar todo seu DNA uma vez? O número de pares de nucleotídeos no cromossomo bacteriano é 3×10^6. A oxidação de uma molécula de glicose fornece cerca de 30 ligações fosfato de alta energia. O peso molecular da glicose é 180 g/mol. (Lembre-se, da Figura 2-3, de que um mol corresponde a 6×10^{23} moléculas.)

QUESTÃO 6-14

Discuta o que está errado na seguinte afirmação, caso esteja errada:

"A estabilidade do DNA tanto nas células reprodutivas como nas somáticas é essencial para a sobrevivência de uma espécie." Explique sua resposta.

QUESTÃO 6-15

Um tipo comum de erro no DNA é produzido por uma reação espontânea chamada de *desaminação*, na qual uma base nucleotídica perde um grupo amino (NH_2) que é substituído por um grupo ceto (C=O) de acordo com a reação geral mostrada na **Figura Q6-15**. Escreva a estrutura das bases A, G, C, T e U e os produtos formados pela desaminação. Observando os produtos dessas reações – e lembrando que, na célula, esses produtos devem ser reconhecidos e reparados – proponha uma explicação para o DNA não conter uracila.

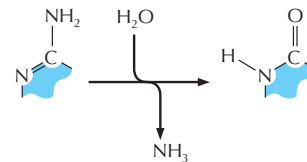



Figura Q6-15

QUESTÃO 6-16

A. Explique por que os telômeros e a telomerase são necessários para a replicação dos cromossomos eucarióticos, mas não para a replicação de um cromossomo bacteriano circular.

B. Os telômeros e a telomerase ainda seriam necessários para completar a replicação dos cromossomos eucarióticos se a DNA-primase adicionasse sempre o iniciador de RNA na extremidade 3′ do molde da fita retardada?

QUESTÃO 6-17

Discuta a seguinte afirmação: "Os vírus existem no limiar da vida: fora das células são apenas um conjunto morto de moléculas; dentro das células, porém, estão muito vivos".

QUESTÃO 6-18

Vários transposons se movem dentro de um genoma por mecanismos replicativos (como aqueles mostrados nas Figuras 6-33 e 6-34). Contudo, eles aumentam o número de suas cópias cada vez que se transpõem. Embora os eventos de transposição individual sejam raros, diversos transposons são encontrados em

cópias múltiplas nos genomas. O que você acredita que evita que os transposons ocupem completamente o genoma de seus hospedeiros?

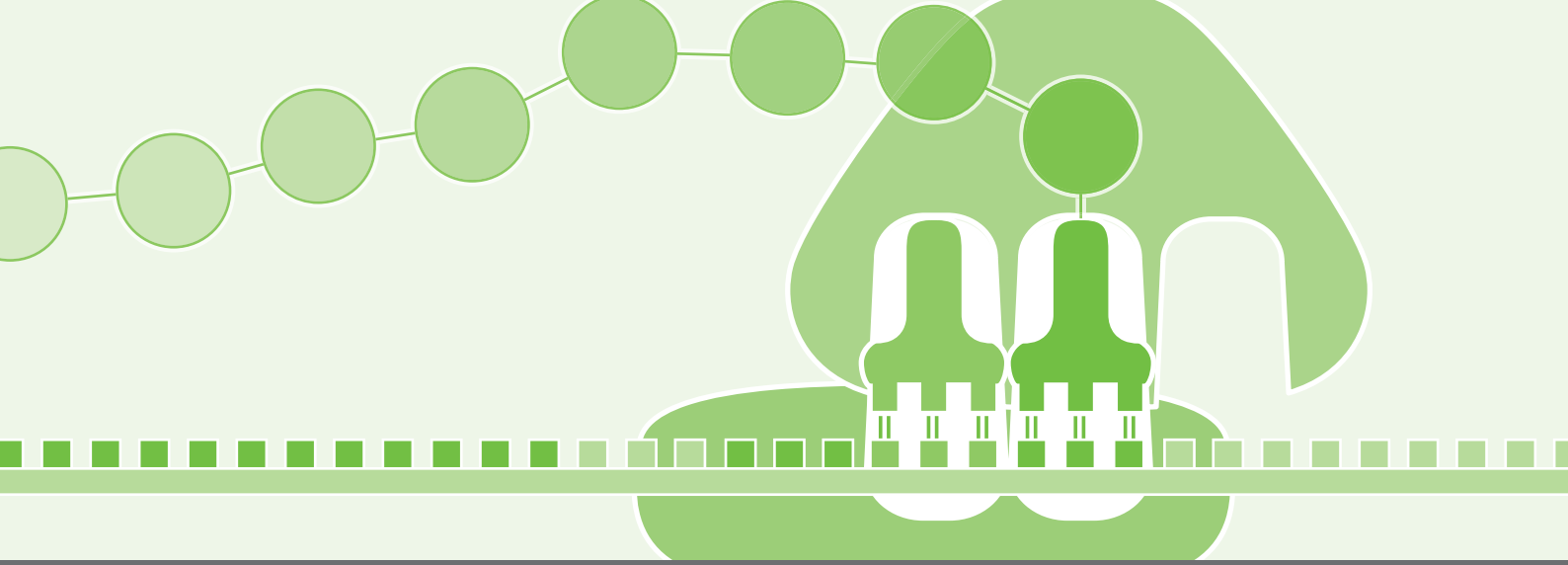
QUESTÃO 6-19

Descreva as consequências que surgiriam caso um cromossomo eucariótico

A. Tivesse apenas uma origem de replicação
   1. Exatamente no centro do cromossomo
   2. Em uma das extremidades do cromossomo

B. Perdesse um ou ambos os telômeros

C. Não possuísse centrômero

Considere que o cromossomo possui 150 milhões de pares de nucleotídeos de comprimento, o tamanho típico de um cromossomo animal, e que a replicação do DNA em células animais ocorre a cerca de 100 nucleotídeos por segundo.

CAPÍTULO 7

Do DNA à Proteína: Como as Células Leem o Genoma

Desde que a estrutura do DNA (ácido desoxirribonucleico) foi determinada no início da década de 1950, tornou-se claro que a informação genética nas células estava codificada na sequência de nucleotídeos do DNA. Vimos, no Capítulo 6, como essa informação pode ser transmitida, de modo conservado, de uma célula aos seus descendentes pelo processo de replicação do DNA. Como uma célula decodifica e usa essa informação? Como as instruções genéticas escritas sob a forma de um alfabeto de apenas quatro "letras" – os quatro diferentes nucleotídeos do DNA – podem levar à formação de uma bactéria, uma mosca-das-frutas ou um ser humano? Se ainda temos muito a aprender a respeito de como a informação estocada nos genes de um organismo leva à produção, mesmo da mais simples das bactérias, o que não dizer de como ela pode direcionar o desenvolvimento de organismos multicelulares complexos, como nós mesmos? No entanto, o código de DNA *per se* já foi decifrado, e a linguagem dos genes pode ser lida.

Mesmo antes da decifração do código de DNA, sabíamos que a informação contida nos genes, de alguma forma, era responsável pelo direcionamento da síntese de proteínas. As proteínas são os principais constituintes das células e determinam não apenas a sua estrutura, mas também o seu funcionamento. Nos capítulos anteriores, deparamo-nos com alguns dos milhares de tipos diferentes de proteínas que podem ser produzidas pelas células. Vimos no Capítulo 4 que as propriedades e funções de uma molécula proteica são determinadas pelo ordenamento linear – *sequência* – das diferentes subunidades de aminoácidos que compõem sua cadeia polipeptídica: cada tipo de proteína possui a sua sequência específica de aminoácidos, e essa sequência dita como a cadeia se dobrará para dar à molécula a sua forma e características químicas específicas. As instruções genéticas transportadas pelo DNA devem, portanto, especificar a sequência de aminoácidos das proteínas. Veremos, no presente capítulo, como isso acontece realmente.

O DNA não dirige a síntese proteica diretamente, mas age como um coordenador, delegando as diferentes tarefas necessárias para a realização do

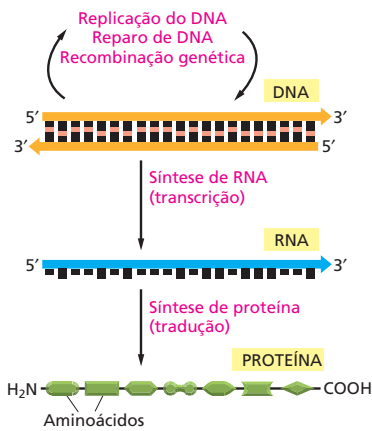



Figura 7-1 A informação genética direciona a síntese de proteínas. O fluxo de informação genética do DNA ao RNA (transcrição) e do RNA à proteína (tradução) ocorre em todas as células vivas.

trabalho a um grupo de colaboradores. Quando uma determinada proteína é necessária na célula, a sequência nucleotídica da porção apropriada da longa molécula de DNA de um cromossomo será inicialmente copiada em um outro tipo de ácido nucleico – *RNA (ácido ribonucleico).* Essas cópias de RNA, formadas a partir de curtos segmentos do DNA, serão usadas como molde para conduzir a síntese da proteína. Milhares dessas conversões de DNA para proteína ocorrem a cada segundo em cada uma das células de nosso organismo. O fluxo de informação genética nas células segue, portanto, uma rota do DNA para o RNA para a proteína (**Figura 7-1**). Todas as células, de bactérias a seres humanos, expressam suas informações genéticas dessa forma – um princípio tão fundamental que foi denominado *dogma central* da biologia molecular.

Neste capítulo, abordaremos os mecanismos pelos quais as células copiam o DNA em RNA (um processo denominado *transcrição)* e, a seguir, utilizam a informação presente no RNA para a produção de proteína (um processo denominado *tradução).* Introduziremos também algumas das principais variações que ocorrem nesse esquema básico. A principal dessas variações é o *splicing de RNA,* um processo ao longo do qual os transcritos de RNA são clivados e reunidos antes que as células eucarióticas os traduzam em proteínas. Essas alterações podem alterar a mensagem transportada pelas moléculas de RNA e, consequentemente, são essenciais para a compreensão dos mecanismos de decodificação do genoma pelas células. Na seção final deste capítulo, consideraremos como o esquema de estoque de informação, de transcrição e de tradução atual deve ter-se originado a partir de sistemas mais simples, nos estágios iniciais da evolução celular.

DO DNA AO RNA

A transcrição e a tradução são as maneiras pelas quais as células leem, ou *expressam*, as suas instruções genéticas – os seus *genes.* Várias cópias idênticas de RNA podem ser feitas a partir de um mesmo gene, e cada molécula de RNA pode direcionar a síntese de várias cópias idênticas de uma molécula proteica. Visto que cada célula contém apenas uma ou duas cópias de um gene determinado, essa amplificação sucessiva permite que as células sejam capazes de sintetizar rapidamente grandes quantidades de uma proteína quando necessário. Ao mesmo tempo, cada gene pode ser transcrito e traduzido em diferentes taxas, possibilitando que a célula produza enormes quantidades de algumas proteínas e, simultaneamente, quantidades minúsculas de outras (**Figura 7-2**). Além disso, como veremos no Capítulo 8, uma célula pode alterar (ou regular) a expressão de cada um dos seus genes de acordo com as necessidades do momento. Nesta seção, discutiremos a produção do RNA – a primeira etapa da *expressão gênica*.

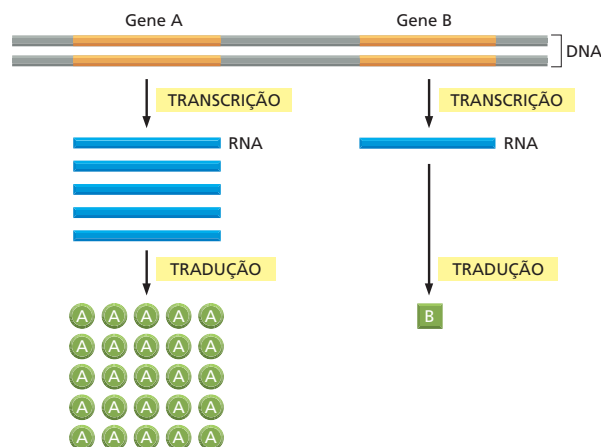



Figura 7-2 Os genes podem ser expressos sob diferentes taxas. O gene A é transcrito e traduzido muito mais eficientemente do que o gene B. Isso permite que a quantidade de proteína A na célula seja muito maior do que a quantidade de proteína B. Nesta figura, e em figuras posteriores, as regiões não transcritas do DNA são representadas em *cinza.*

Os segmentos da sequência de DNA são transcritos em RNA

O primeiro passo que uma célula dá para a leitura de um dos seus milhares de genes é a cópia da sequência nucleotídica desse gene sob a forma de RNA. Esse processo é denominado **transcrição**, pois a informação, apesar de copiada sob uma nova forma química, permanece escrita essencialmente sob a mesma linguagem – a linguagem dos nucleotídeos. Assim como o DNA, o **RNA** é um polímero linear composto por quatro diferentes tipos de subunidades nucleotídicas unidas entre si por ligações fosfodiéster (**Figura 7-3**). Ele se diferencia do DNA, em termos químicos, sob dois aspectos: (1) os nucleotídeos no RNA são *ribonucleotídeos* – ou seja, eles contêm o açúcar ribose (origem do nome ácido *ri*bonucleico), em vez de desoxirribose; (2) embora, como o DNA, o RNA contenha as bases adenina (A), guanina (G) e citosina (C), ele contém uracila (U) em vez da timina (T) encontrada no DNA. Visto que U, assim como T, pode formar pares de bases pelo estabelecimento de pontes de hidrogênio com A (**Figura 7-4**), as propriedades de complementaridade de base descritas para o DNA no Capítulo 5 também se aplicam ao RNA.

Apesar de apresentarem composição química bastante semelhante, a estrutura geral do DNA e do RNA difere drasticamente. Enquanto o DNA sempre ocorre nas células sob a forma de uma hélice de fita-dupla, o RNA se apresenta como fita simples. Essa diferença tem importantes consequências funcionais. Visto que a cadeia de RNA é de fita simples, ela pode dobrar-se sobre ela própria adquirindo diferentes formas, exatamente como ocorre com o dobramento de uma cadeia polipeptídica na estruturação final de uma proteína (**Figura 7-5**); o DNA de fita dupla não pode dobrar-se desse modo. Como veremos, mais adiante neste capítulo, a capacidade de dobrar-se em estruturas tridimensionais complexas permite que o RNA desempenhe funções na célula que vão muito além das de simples intermediário de informações entre DNA e proteína. Enquanto o DNA atua unicamente no estoque de informações, o RNA se apresenta sob diversas formas, algumas com funções estruturais ou mesmo capazes de desempenhar funções catalíticas.

QUESTÃO 7-1

Considere a expressão "dogma central", referente ao fluxo da informação genética do DNA para o RNA e, a seguir, para proteína. A palavra "dogma" é apropriada nesse contexto?

Figura 7-3 A estrutura química do RNA se diferencia ligeiramente da estrutura do DNA. (A) O RNA contém o açúcar ribose, o qual difere da desoxirribose, o açúcar utilizado no DNA pela presença de um grupo –OH adicional. (B) O RNA contém a base uracila, a qual difere da timina, a base equivalente no DNA, pela ausência de um grupo –CH3. (C) Um pequeno fragmento de RNA. A ligação química entre nucleotídeos no RNA é a mesma que ocorre no DNA.

Figura 7-4 A uracila forma pares de bases com a adenina. Apesar da ausência de um grupo metila, a uracila apresenta as mesmas propriedades de pareamento da timina. Assim, pares de bases U-A se assemelham bastante a pares de bases T-A (ver Figura 5-6A).

A transcrição produz um RNA complementar a uma das fitas do DNA

Todo o RNA de uma célula é produzido a partir da transcrição, um processo que apresenta certas similaridades com a replicação do DNA (discutida no Capítulo 6). A transcrição tem início com a abertura e o desespiralamento de uma pequena porção da dupla-hélice de DNA para que sejam expostas as bases de ambas as fitas do DNA. A seguir, uma das duas fitas do DNA de dupla-hélice atuará como molde para a síntese do RNA. Os ribonucleotídeos são adicionados, um a um, à cadeia de RNA em crescimento, e, da mesma forma que ocorre na replicação do DNA, a sequência nucleotídica da cadeia de RNA é determinada pelo pareamento por complementaridade de bases com o DNA-molde. Quando um pareamento correto é feito, o ribonucleotídeo recém-chegado é ligado covalentemente à fita de RNA em crescimento por meio de uma reação catalisada enzimaticamente. A cadeia de RNA produzida pela transcrição – o *transcrito* – é, desse modo, estendida nucleotídeo a nucleotídeo e apresenta sequência nucleotídica exatamente complementar à fita de DNA usada como molde (**Figura 7-6**).

A transcrição, no entanto, difere da replicação do DNA em vários pontos essenciais. Diferentemente de uma fita de DNA recém-formada, a fita de RNA não permanece ligada à fita de DNA-molde por meio de pontes de hidrogênio. Em vez disso, em uma região imediatamente além da região onde os ribonucleotídeos estão sendo inseridos, a cadeia de RNA é deslocada, e a hélice de DNA é reestruturada. Por essa razão – e considerando que apenas uma fita da molécula de DNA é transcrita –, as moléculas de RNA são de fita simples. Além disso, como os RNAs são copiados a partir de uma região delimitada do DNA, essas moléculas são muito mais curtas do que as moléculas de DNA; as moléculas de DNA em um cromossomo humano podem alcançar um comprimento de até 250 milhões de pares de nucleotídeos, ao passo que a maioria dos RNAs não possui um comprimento maior do que uns poucos milhares de nucleotídeos, sendo muitos deles ainda bem menores do que isso.

As enzimas que realizam a transcrição são chamadas de **RNA-polimerases**. Assim como a DNA-polimerase que catalisa a replicação do DNA (discutida

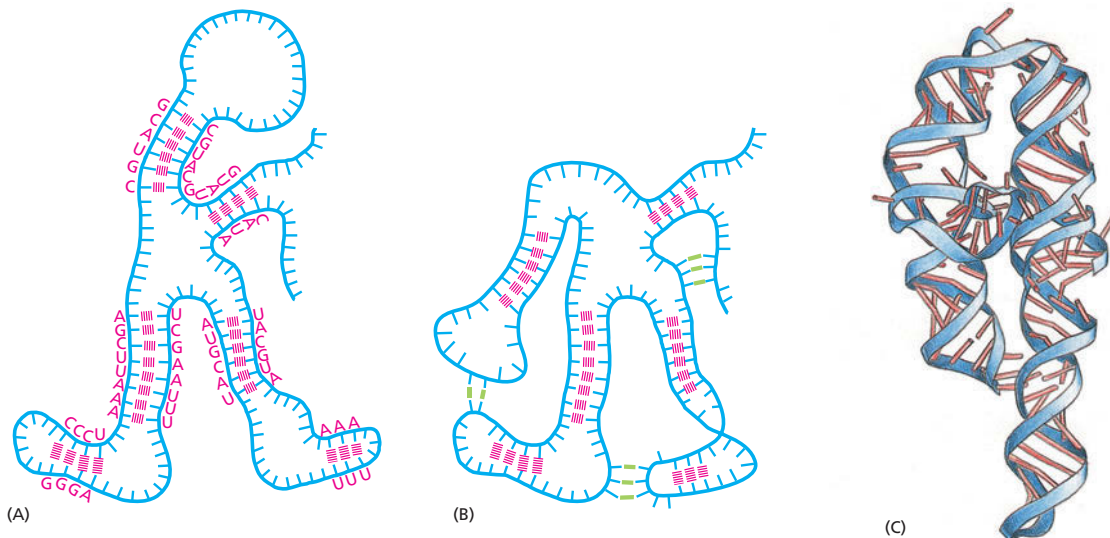



Figura 7-5 O RNA pode formar pares de bases intramolecularmente e se dobrar em estruturas específicas. O RNA é uma fita simples, mas frequentemente contém pequenos segmentos de nucleotídeos que podem sofrer pareamento com sequências complementares encontradas em outras regiões da mesma molécula. Tais interações, em adição a pareamentos "não convencionais", permitem que uma molécula de RNA se dobre, adquirindo uma estrutura tridimensional, a qual é determinada por sua sequência de nucleotídeos. (A) Diagrama de uma estrutura hipotética de RNA dobrada, ilustrando somente interações convencionais (ou seja, Watson-Crick) entre pares de bases; (B) a mesma estrutura hipotética com ambos os tipos de pareamento, convencionais (*vermelho*) e não convencionais (p. ex., A-G) (*verde*); (C) estrutura de um RNA real, uma molécula envolvida no *splicing* de RNA. Cada pareamento convencional está indicado por um "traço" na dupla-hélice. Bases em outras configurações estão indicadas por traços quebrados. Para visualização adicional da estrutura do RNA, ver **Animação 7.1**.

no Capítulo 6), as RNA-polimerases catalisam a formação de ligações fosfodiéster que unem os nucleotídeos e formam o esqueleto açúcar-fosfato de uma cadeia de RNA. A RNA-polimerase se move paulatinamente sobre o DNA, desenrolando a hélice de DNA à sua frente e expondo a nova região de fita-molde para que ocorra o pareamento por complementaridade de bases. Desse modo, a cadeia de RNA em crescimento é estendida nucleotídeo a nucleotídeo na direção 5′– 3′ (**Figura 7-7**). A enzima utiliza ribonucleosídeos trifosfato (ATP, CTP, UTP e GTP), cujas ligações de alta energia fornecem a energia que direciona a continuidade da reação (ver Figura 6-10).

A liberação quase imediata da fita de RNA recém-sintetizada da fita de DNA-molde faz com que muitas cópias de RNA possam ser feitas a partir de um único gene, em um intervalo de tempo relativamente curto; a síntese do próximo RNA é geralmente iniciada antes que a primeira cópia de RNA esteja completa (**Figura 7-8**). Um gene de tamanho mediano (digamos, 1.500 pares de nucleotídeos) leva aproximadamente 50 segundos para ser transcrito por uma molécula de RNA-polimerase (**Animação 7.2**). Em um momento específico qualquer, podem existir até 15 polimerases percorrendo esse pequeno segmento de DNA, umas nos calcanhares das outras, o que permite a síntese de mais de 1.000 transcritos em um período de uma hora. Na maioria dos genes, entretanto, a taxa de transcrição é bem mais baixa do que essa.

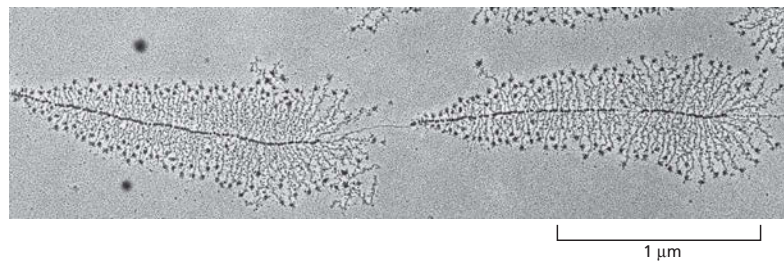
Apesar de a RNA-polimerase catalisar essencialmente a mesma reação química que a DNA-polimerase, existem algumas diferenças importantes entre essas duas enzimas. A primeira, e mais óbvia, é que a RNA-polimerase catalisa a ligação de ribonucleotídeos, em vez de desoxirribonucleotídeos. A segunda é que, contrariamente à DNA-polimerase, envolvida na replicação de DNA, as RNA-polimerases podem dar início à síntese de uma cadeia de RNA na ausência de um iniciador. Essa diferença ocorre porque a transcrição não precisa acontecer de forma tão exata quanto a replicação do DNA; diferentemente do DNA, o RNA não é usado como forma de estoque permanente da informação genética nas células. Assim, pequenos erros nos transcritos de RNA levam a consequências relativamente desprezíveis. As RNA-polimerases possuem uma taxa de erro de aproximadamente um em cada 10^4 nucleotídeos copiados, comparada com uma taxa de erro da DNA-polimerase de aproximadamente um em cada 10^7 nucleotídeos.

Figura 7-6 A transcrição produz uma molécula de RNA complementar a uma das fitas do DNA. A fita de DNA não molde (a fita *superior* neste exemplo) é algumas vezes denominada *fita codificadora*, pois sua sequência é equivalente à sequência do RNA produzido.

Os diversos tipos de RNAs são produzidos nas células

A grande maioria dos genes que existem no DNA de uma célula codifica as sequências de aminoácidos de proteínas, e as moléculas de RNA copiadas a partir desses genes (e que direcionam a síntese das proteínas) são coletivamente chamadas de **RNA mensageiro (mRNA)**. Em eucariotos, cada mRNA tipicamente possui informação transcrita a partir de um único gene e codifica uma única proteína. Em bactérias, um conjunto de genes adjacentes é frequentemente transcrito em um único mRNA que, consequentemente, possui informação para a produção de diferentes proteínas.

Figura 7-7 O DNA é transcrito pela enzima RNA-polimerase. A RNA-polimerase (*azul-claro*) se move paulatinamente sobre o DNA, desespiralizando a hélice de DNA à sua frente. Conforme avança, a polimerase adiciona nucleotídeos (*pequenos objetos representados em "T"*) um a um à cadeia de RNA, no sítio de polimerização, usando uma fita de DNA exposta como molde. Consequentemente, o RNA transcrito é uma cópia complementar da fita simples de uma das duas fitas do DNA. Conforme se move sobre o DNA-molde, a polimerase desloca o RNA recém-formado, permitindo que as duas fitas de DNA se reassociem na região posterior da mesma. Uma região curta de hélice híbrida DNA/RNA (de aproximadamente nove nucleotídeos de comprimento) é formada temporariamente, fazendo com que uma "janela" da hélice DNA/ RNA se mova ao longo do DNA junto à polimerase (**Animação 7.2**).

Figura 7-8 A transcrição pode ser visualizada sob microscopia eletrônica. A microfotografia mostra diversas moléculas de RNA-polimerase transcrevendo simultaneamente dois genes adjacentes. As moléculas de RNA-polimerase são visualizadas como uma série de pontos ao longo do DNA, com os transcritos (filamentos finos) ligados a elas. As moléculas de RNA (denominadas rRNAs) transcritas a partir dos genes ilustrados neste exemplo não são traduzidas em proteína, sendo utilizadas diretamente como componentes dos ribossomos, as máquinas onde a tradução ocorre. Acredita-se que as partículas na extremidade 5' (a extremidade livre) de cada transcrito rRNA sejam proteínas ribossomais que se associaram ao rRNA. (Cortesia de Ulrich Scheer.)

O produto final de outros genes, no entanto, é o próprio RNA (Tabela 7-1). Como veremos em seções posteriores do presente capítulo, esses RNAs não mensageiros, assim como as proteínas, atuam como componentes regulatórios, estruturais e enzimáticos das células e desempenham papéis essenciais na tradução da mensagem genética em proteína. O *RNA ribossomal (rRNA)* forma a região central dos ribossomos, na qual o mRNA é traduzido em proteínas, e o *RNA transportador (tRNA)* forma os adaptadores que selecionam os aminoácidos e os posicionam no local adequado do ribossomo para que eles sejam incorporados em uma proteína. Outros pequenos RNAs, denominados *microRNAs* (mi*RNAs*), atuam como importantes reguladores na expressão gênica em eucariotos, como discutiremos no Capítulo 8.

Em seu sentido mais amplo, o termo **expressão gênica** se refere ao processo pelo qual a informação codificada na sequência de DNA é traduzida em um produto que desencadeia um efeito determinado sobre uma célula ou organismo. Nos casos em que o produto final do gene é uma proteína, a expressão gênica inclui tanto a transcrição quanto a tradução. Quando uma molécula de RNA é o produto final do gene, entretanto, a expressão gênica não requer a tradução.

QUESTÃO 7-2

Na microfotografia eletrônica da Figura 7-8, as moléculas de RNA-polimerase estão se movendo da direita para a esquerda ou da esquerda para a direita? Por que os transcritos de RNA são muito mais curtos do que o DNA que os codifica?

Sinais no DNA indicam os pontos de início e de término para a RNA-polimerase

A iniciação da transcrição é um processo especialmente importante, pois é o principal momento no qual a célula pode selecionar quais proteínas ou RNAs que deverão ser produzidos e a sua taxa de síntese. Para dar início à transcrição, a RNA-polimerase deve ser capaz de reconhecer o início de um gene e ligar-se firmemente ao DNA sobre esse ponto. O modo pelo qual as RNA-polimerases reconhecem o sítio de início de transcrição difere consideravelmente entre bactérias e eucariotos. Visto que essa situação é mais simples em bactérias, inicialmente nos deteremos no sistema procarioto.

Quando uma RNA-polimerase colide aleatoriamente com uma porção de DNA, ela se liga fracamente à dupla-hélice e começa a deslizar rapidamente sobre o DNA. A enzima se agarra fortemente ao DNA apenas quando encontra uma região denominada **promotor**, a qual contém uma sequência específica de nucleotídeos indicadora do ponto de iniciação para a síntese de RNA. Após ter feito contato com o promotor e ter-se fixado fortemente ao DNA, a RNA-polimerase

TABELA 7-1 Tipos de RNAs produzidos nas células

Tipo de RNA	Função
mRNAs	Codificam proteínas
rRNAs	Formam a região central do ribossomo e catalisam a síntese proteica
miRNAs	Regulam a expressão de genes
tRNAs	Usados como adaptadores entre o mRNA e os aminoácidos durante a síntese proteica
Outros pequenos RNAs	Usados no *splicing* do mRNA, na manutenção de telômeros e em diversos outros processos celulares

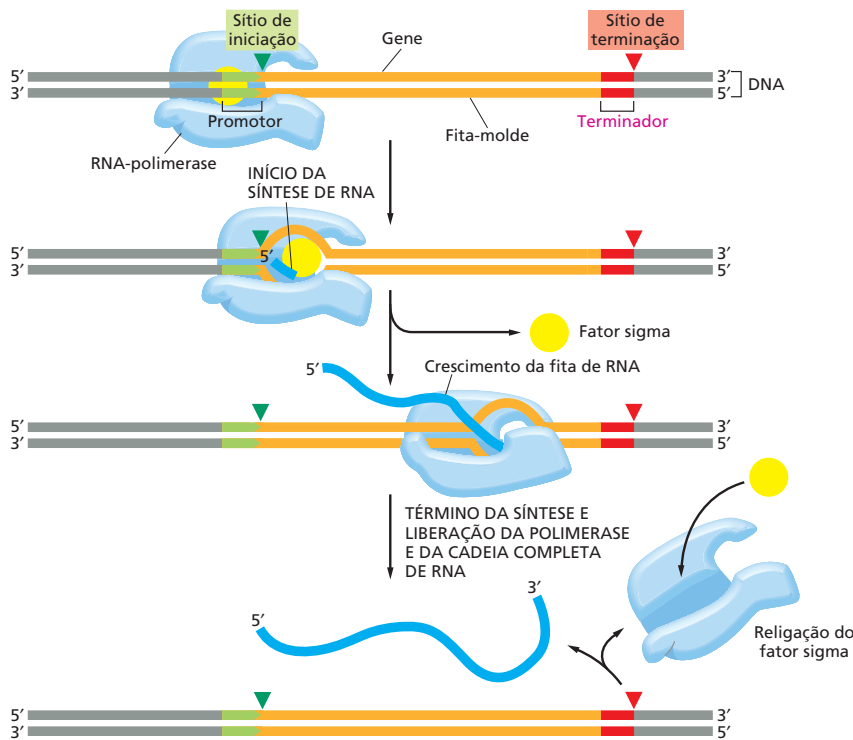



Figura 7-9 Sinais na sequência de um gene indicam à RNA-polimerase bacteriana onde iniciar e terminar a transcrição. A RNA-polimerase bacteriana (*azul-claro*) contém uma subunidade denominada fator sigma (*amarelo*) que reconhece o promotor (*verde*) sobre o DNA. Após o início da transcrição, o fator sigma é liberado, e a polimerase dá continuidade à síntese do RNA sem a presença do fator. A extensão da cadeia continua até que a polimerase encontre um sinal de terminação (*vermelho*) sobre o DNA. Nesse ponto, a enzima se detém e libera tanto a fita-molde de DNA quanto o rRNA recém-sintetizado. A seguir, a polimerase se reassocia a um fator sigma livre e recomeça a busca por outro promotor para reiniciar o processo.

abre a dupla-hélice imediatamente à sua frente e expõe os nucleotídeos de ambas as fitas, ao longo de uma curta extensão da molécula de DNA (**Figura 7-9**). A seguir, uma das duas fitas expostas do DNA atua como molde para o pareamento de bases por complementaridade a ser realizado com ribonucleotídeos que estão chegando, dois dos quais são unidos entre si pela polimerase para dar início à cadeia de RNA. Por meio desse sistema, a extensão da cadeia continua até que a enzima encontre um segundo sinal sobre o DNA, o *terminador* (ou sítio de parada), onde a polimerase se detém e libera tanto o DNA-molde quanto a cadeia de RNA recém-sintetizada (ver Figura 7-9).

Em bactérias, uma subunidade da polimerase, denominada *fator sigma* (σ), é a principal responsável pelo reconhecimento da sequência promotora sobre o DNA. Após ter fixado fortemente a polimerase sobre o DNA nesse sítio, e essa ter sintetizado aproximadamente 10 nucleotídeos de RNA, o fator sigma é liberado, permitindo que a polimerase avance e continue a transcrição sem sua presença. Após ter sido liberada na região terminadora, a polimerase se reassocia a um fator sigma livre e parte em busca de um promotor, onde pode dar novo início ao processo de transcrição.

A proteína polimerase pode reconhecer o promotor, mesmo considerando-se que o DNA esteja sob sua forma de dupla-hélice, por meio do estabelecimento de contatos específicos com porções de bases que estão expostas na superfície externa da hélice. As sequências nucleotídicas de um promotor típico – e de um terminador típico – são apresentadas na **Figura 7-10**.

Visto que o DNA é uma fita dupla, um promotor pode, em princípio, direcionar a síntese de dois transcritos diferentes de RNA, um a ser transcrito rumo à esquerda e outro rumo à direita. No entanto, o promotor é assimétrico e se associa à polimerase sob uma orientação única; assim, uma vez adequadamente posicionada sobre um promotor, a RNA-polimerase não tem escolha a não ser transcrever a fita apropriada de DNA, pois a transcrição só ocorre no sentido de 5′ – 3′. O sentido de transcrição, no que diz respeito ao cromossomo como um todo, pode variar de acordo com o gene que está sendo considerado (**Figura 7-11**). A necessidade de forte ligação da RNA-polimerase ao DNA antes que essa possa dar início à transcrição significa que um segmento de DNA só po-

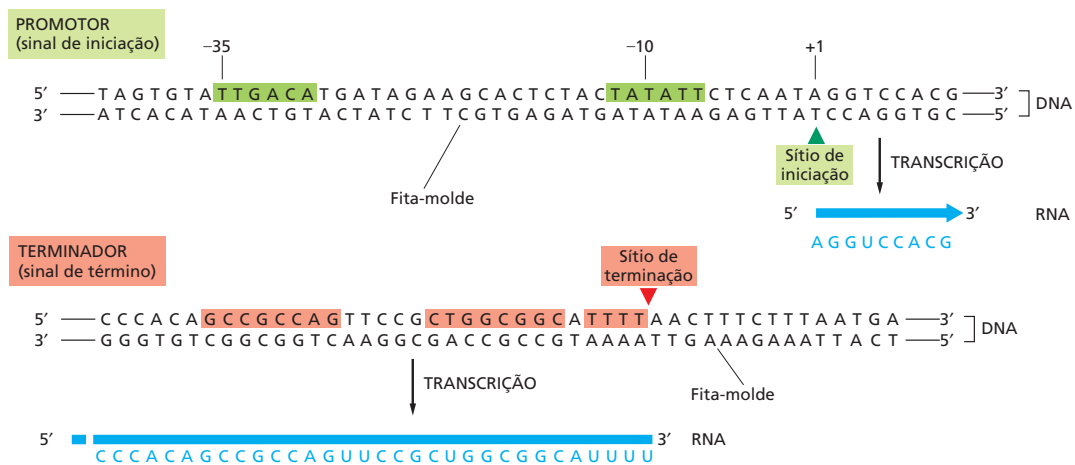



Figura 7-10 **Promotores e terminadores bacterianos possuem sequências nucleotídicas específicas que são reconhecidas pela RNA-polimerase.** As regiões sombreadas em *verde* na parte superior do diagrama representam as sequências de DNA que determinam um promotor. Os números representam a posição do nucleotídeo, contada a partir do primeiro nucleotídeo transcrito, o qual é denominado +1. A assimetria do promotor – por exemplo, o posicionamento das sequências conservadas a –35 e a –10 antes do gene – orienta a polimerase e determina a direção da transcrição. Todos os promotores bacterianos possuem sequências de DNA a –10 e a –35 que se assemelham bastante às ilustradas aqui. As regiões sombreadas em *vermelho* na parte inferior do diagrama representam sequências que sinalizam o término de transcrição para a RNA-polimerase.

derá ser transcrito se for precedido por uma sequência promotora. Isso assegura que apenas aquelas porções da molécula de DNA que contêm um gene serão transcritos em RNA.

A iniciação da transcrição de genes em eucariotos é um processo complexo

Muitos dos princípios descritos para a transcrição em bactérias também se aplicam para eucariotos. No entanto, a iniciação da transcrição em eucariotos se diferencia da de bactérias em uma série de pontos importantes:

- A primeira diferença reside nas próprias RNA-polimerases. Enquanto bactérias contêm um único tipo de RNA-polimerase, as células de eucariotos possuem três – *RNA-polimerase I*, *RNA-polimerase II* e *RNA-polimerase III*. Essas polimerases são responsáveis pela transcrição de diferentes tipos de genes. As RNA-polimerases I e III transcrevem os genes que codificam os RNA transportadores, o RNA ribossomal e os pequenos RNAs que desempenham papel estrutural e catalítico nas células (**Tabela 7-2**). A RNA-polimerase II transcreve a ampla maioria dos genes eucariotos, incluindo todos aqueles que codificam proteínas (**Animação 7.3**). Em vista disso, nossa discussão a seguir focará essa enzima.
- Uma segunda diferença é que, enquanto a RNA-polimerase bacteriana (em conjunto a sua subunidade sigma) é capaz de dar início ao processo de transcrição independentemente, as RNA-polimerases de eucariotos necessitam da assistência de um grande conjunto de proteínas acessórias. Essenciais entre essas proteínas acessórias se encontram os *fatores gerais de transcrição*, que devem associar-se a cada promotor, em conjunto com a polimerase, antes que a polimerase possa iniciar a transcrição.
- Uma terceira característica diferencial na transcrição de eucariotos é que os mecanismos que controlam a sua iniciação são muito mais complexos do que os existentes em procariotos – um ponto que será amplamente discutido no Capítulo 8. Em bactérias, os genes tendem a organizar-se sobre o DNA próximos uns dos outros, com apenas pequenas regiões de DNA não transcritas intercaladas entre eles. No entanto, tanto no DNA vegetal quanto no de animais, inclusive em seres humanos, os genes se encon-

Figura 7-11 **Alguns genes são transcritos usando uma das fitas de DNA como molde, ao passo que outros genes são transcritos a partir da fita oposta.** A direção da transcrição é determinada pela orientação do promotor presente no início de cada gene (setas em *verde*). Os genes transcritos da esquerda para a direita utilizam a fita inferior de DNA como molde; aqueles transcritos da direita para a esquerda utilizam a fita superior como molde (ver Figura 7-10). Uma parcela de aproximadamente 0,2% (10.000 pares de nucleotídeos) do cromossomo de *E. coli* está ilustrada nesta figura.

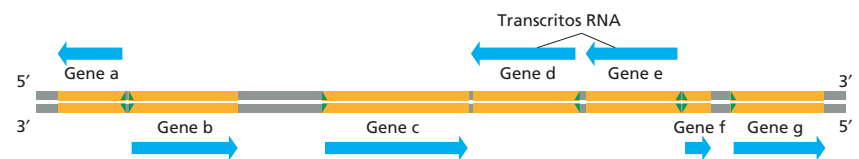



TABELA 7-2 As três RNA-polimerases de células eucarióticas

Tipo de polimerase	Genes transcritos
RNA-polimerase I	A maioria dos genes de rRNAs
RNA-polimerase II	Genes codificadores de proteínas, genes de miRNAs e genes para alguns pequenos RNAs (p. ex., aqueles referentes aos spliceossomos)
RNA-polimerase III	Genes de tRNAs Gene do rRNA 5S Genes de diversos outros pequenos RNAs

tram amplamente dispersos, existindo regiões de DNA com comprimento de até 100.000 pares de nucleotídeos entre um gene e o seguinte. Essa arquitetura permite que um único gene esteja sob o controle de um número praticamente ilimitado de sequências regulatórias espalhadas no DNA, permitindo que os eucariotos se engajem em sistemas de regulação de transcrição muito mais complexos do que os existentes nas bactérias.

- Por último, mas não menos importante, a iniciação da transcrição em eucariotos deve levar em consideração o empacotamento do DNA em nucleossomos e em formas mais compactas da estrutura de cromatina, como descrito no Capítulo 8.

QUESTÃO 7-3

Pode a RNA-polimerase usada na transcrição ser usada como polimerase para produzir o iniciador necessário para a replicação (discutida no Capítulo 6)?

Agora, voltaremos nossa atenção aos fatores gerais de transcrição e discutiremos como eles auxiliam a RNA-polimerase II dos eucariotos na iniciação da transcrição.

A RNA-polimerase de eucariotos necessita de fatores gerais de transcrição

A descoberta inicial demonstrando que a RNA-polimerase II purificada de eucariotos, diferentemente da RNA-polimerase bacteriana, não era capaz de iniciar independentemente a transcrição *in vitro* levou à descoberta e à purificação dos **fatores gerais de transcrição**. Essas proteínas acessórias se ligam ao promotor, onde posicionam a RNA-polimerase, deslocam e separam a dupla-hélice para expor a fita-molde e direcionam a RNA-polimerase para dar início ao processo de transcrição.

A Figura 7-12 ilustra como ocorre a montagem e a ligação dos fatores gerais de transcrição sobre um promotor reconhecido pela RNA-polimerase II. Esse processo de montagem começa tipicamente por meio da ligação do fator geral de transcrição TFIID a uma pequena sequência de DNA de dupla-hélice composta predominantemente por nucleotídeos T e A; devido à sua composição, essa sequência é conhecida como sequência TATA ou *TATA box*. Por meio de sua ligação ao DNA, o TFIID provoca uma grande distorção local no DNA (Figura 7-13), a qual atua como uma marca sinalizadora para a subsequente montagem e agregação de outras proteínas sobre o promotor. O TATA box é um componente crucial de diversos promotores reconhecidos pela RNA-polimerase II e se encontra geralmente localizado a uma distância de 25 nucleotídeos antes do sítio de início

Figura 7-12 **Para dar início à transcrição, a RNA-polimerase eucariótica necessita de um conjunto de fatores gerais de transcrição.** Esses fatores de transcrição são denominados TFIIA, TFIIB e assim por diante. (A) Diversos promotores contêm uma sequência de DNA chamada de TATA box. (B) O TATA box é reconhecido pelo fator de transcrição TFIID que se liga a ele e permite a ligação subsequente do TFIIB. (C). Por questões de simplificação, a distorção do DNA produzida pela ligação do TFIID (ver Figura 7-13) não foi ilustrada. (D) Os demais fatores gerais de transcrição, assim como a própria RNA-polimerase, se associam ao promotor. (E) A seguir, o TFIIH separa as fitas da dupla-hélice no ponto de início da transcrição, usando energia da hidrólise de ATP, e faz com que a fita-molde seja exposta. O TFIIH também fosforila a RNA-polimerase II, liberando-a dos fatores gerais de transcrição, o que permite que tenha início a fase de extensão da transcrição. O sítio de fosforilação consiste em uma longa "cauda" polipeptídica que se estende a partir da molécula polimerase.

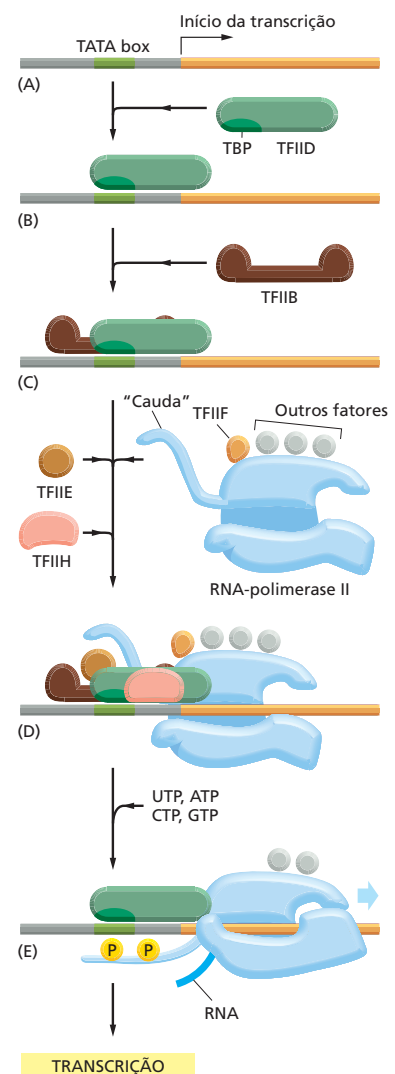
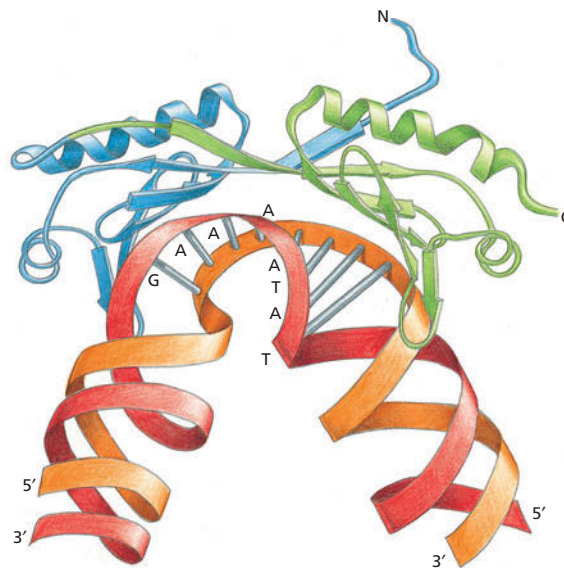



Figura 7-13 A proteína de ligação ao TATA (TBP) se liga a sequências TATA box e provoca distorções no DNA. A TBP é a subunidade do fator geral de transcrição TFIID responsável pelo reconhecimento e ligação à sequência TATA box (indicada por letras). A flexão característica do DNA, provocada pela TBP – duas torções na dupla-hélice separadas por DNA parcialmente desespiralizado –, pode provavelmente atrair os outros fatores gerais de transcrição. A TBP é uma cadeia polipeptídica única dobrada em dois domínios bastante similares (*azul* e *verde*). Seus oito folhetos β se deitam sobre a hélice do DNA como uma sela sobre um cavalo (**Animação 7.4**). (Adaptado de J.L. Kim *et al*., *Nature* 365:520-527, 1993. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

da transcrição. Uma vez que o primeiro fator geral de transcrição se tenha associado a esse sítio do DNA, os outros fatores e a RNA-polimerase II também são associados, para a formação de um *complexo de iniciação de transcrição* completo. Embora Figura 7-12 ilustre os fatores gerais de transcrição associando-se sobre o promotor em uma ordem determinada, a sequência exata de montagem provavelmente é diferente entre diferentes promotores presentes em uma célula.

Depois de a RNA-polimerase ter sido conectada ao DNA promotor por meio do complexo de iniciação de transcrição, ela deve ser liberada do complexo de fatores de transcrição para que possa dar início à sua tarefa de produção de uma molécula de RNA. Uma etapa essencial para essa liberação consiste na adição de grupos fosfato à "cauda" da RNA-polimerase, ação essa desempenhada pelo fator geral de transcrição TFIIH, o qual contém uma das suas subunidades com atividade de enzima proteína-cinase (ver Figura 7-12E). Acredita-se que essa fosforilação auxilie a dissociação da polimerase do grupo de fatores de transcrição, permitindo que a transcrição tenha início. Uma vez a transcrição iniciada, a maioria dos fatores de transcrição é liberada do DNA, de tal forma que essas moléculas estarão disponíveis para iniciar outro ciclo de transcrição com outra molécula de RNA-polimerase. Quando a RNA-polimerase II finaliza a transcrição, ela é liberada do DNA, os fosfatos de sua cauda são eliminados por meio de fosfatases, e ela pode reiniciar outro processo de transcrição. Apenas a forma defosforilada da RNA-polimerase II é capaz de dar início à síntese de RNA sobre um promotor.

Os RNAs eucarióticos são transcritos e processados simultaneamente no núcleo

Apesar de o princípio de molde pelo qual o DNA é transcrito em RNA ser o mesmo em todos os organismos, o modo segundo o qual os transcritos são manipulados antes de poderem ser utilizados pela célula difere bastante entre bactérias e eucariotos. O DNA bacteriano permanece exposto diretamente no citoplasma, onde se localizam os *ribossomos* nos quais a síntese proteica ocorre. Conforme as moléculas de RNA bacteriano estão sendo transcritas, os ribossomos imediatamente se ligam à extremidade 5′ livre do transcrito de RNA e dão início à síntese proteica.

Nas células eucarióticas, em contraste, o DNA está isolado dentro do *núcleo*. A transcrição ocorre no núcleo, mas a síntese de proteínas ocorre nos ribossomos que se encontram no citoplasma. Desse modo, antes que um mRNA eucariótico possa ser traduzido, ele deverá ser transportado para fora do núcleo por pequenos poros existentes no envelope nuclear (**Figura 7-14**). No entanto, antes que um mRNA

Nucléolo
Núcleo
Citoplasma
5 µm

Figura 7-14 Antes de poderem ser traduzidas, as moléculas de mRNA produzidas no núcleo migram para o citoplasma pelos poros presentes no envelope nuclear (setas). Aqui está ilustrada uma seção do núcleo de um hepatócito. (De D.W. Fawcett, A Textbook of Histology, 11. ed. Filadélfia: Saunders, 1986. Com permissão de Elsevier.)

eucariótico saia do núcleo, ele deverá passar por uma série de diferentes etapas que compõem o **processamento do RNA**. Essas reações ocorrem enquanto o RNA ainda está sendo transcrito. As enzimas responsáveis pelo processamento do RNA se associam à "cauda" da RNA-polimerase eucariótica quando esta está transcrevendo um RNA, podendo saltar sobre a molécula de RNA nascente e começar a processá-la no momento em que essa emerge da RNA-polimerase (**Figura 7-15**).

Dependendo do tipo de RNA que está sendo produzido – um mRNA ou algum outro tipo –, os transcritos são processados de um modo específico antes de deixar o núcleo. Duas etapas do processamento que ocorrem apenas em transcritos destinados a tornarem-se moléculas mRNA são o *capeamento* e a *poliadenilação* (**Figura 7-16**):

1. O capeamento do RNA envolve uma modificação da extremidade 5′ do transcrito de mRNA, a extremidade que é sintetizada em primeiro lugar durante a transcrição. O RNA é capeado pela adição de um nucleotídeo atípico – um nucleotídeo guanina (G) com um grupo metila associado. Esse capeamento ocorre após a RNA-polimerase ter sintetizado um fragmento de aproximadamente 25 nucleotídeos de RNA, muito antes que a transcrição do gene esteja completa.
2. A poliadenilação provê uma estrutura especial, ou cauda, para a extremidade 3′ da maioria dos mRNAs recém-sintetizados. Em contraste com as bactérias, onde a extremidade 3′ de um mRNA é simplesmente o final da cadeia sintetizada pela RNA-polimerase, as extremidades 3′ de RNAs eucarióticos são inicialmente clivadas por uma enzima que corta o RNA em uma sequência particular de nucleotídeos e, a seguir, são complementadas por uma segunda enzima que adiciona uma série repetitiva de nucleotídeos adenina (A) (uma cauda poli-A) sobre a extremidade clivada. Essa *cauda poli-A* geralmente possui um comprimento de algumas centenas de nucleotídeos.

Acredita-se que essas duas modificações – capeamento e poliadenilação – aumentem a estabilidade da molécula de mRNA eucariótica, auxiliando sua exportação do núcleo para o citoplasma e sua identificação geral como mRNA. Elas também são utilizadas pela maquinaria de síntese de proteínas, antes do início da síntese, como um indicador de que ambas as extremidades do mRNA estão presentes e, consequentemente, de que essa mensagem está completa.

RNA-polimerase II
Fatores de poliadenilação
Fatores de *splicing*
Fatores de capeamento
mRNA
INÍCIO DO PROCESSAMENTO DO RNA

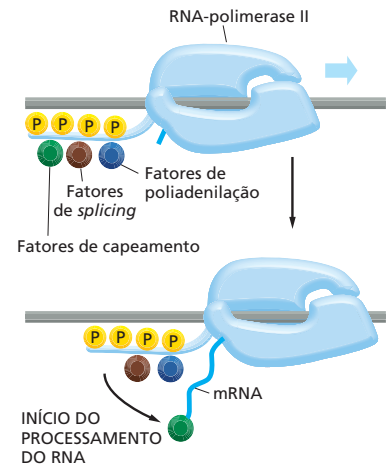



Figura 7-15 **A fosforilação da RNA-polimerase II permite que proteínas de processamento de RNA se associem à sua cauda.** A polimerase não apenas transcreve o DNA, como também carrega as proteínas responsáveis pelo processamento do RNA, as quais atuam sobre o RNA recém-sintetizado. Algumas proteínas de processamento do RNA se ligam à cauda da RNA-polimerase quando essa é fosforilada no período tardio do processo de iniciação da transcrição (ver Figura 7-12). O capeamento, a poliadenilação e o *splicing* (descritos mais tarde neste capítulo) são modificações efetuadas sobre o RNA durante o processamento.

Os genes eucarióticos são interrompidos por sequências não codificadoras

A maioria dos RNAs eucarióticos passa por uma etapa adicional de processamento antes de tornarem-se uma molécula funcional. Essa etapa envolve uma

Figura 7-16 **As moléculas de mRNA eucariótico são modificadas pelo capeamento e pela poliadenilação.** (A) As extremidades de um mRNA eucariótico são modificadas por meio da adição de um quepe na extremidade 5′ e pela clivagem do transcrito primário e adição de uma cauda poli-A na extremidade 3′. (B) A estrutura do quepe na extremidade 5′ de moléculas de mRNA eucarióticas. Observe a ligação incomum 5′– 5′ do 7-metil G ao restante do RNA. Diversos quepes de mRNA eucarióticos apresentam uma modificação adicional: a metilação de um grupo 2′- hidroxila do segundo açúcar-ribose no mRNA (não ilustrada).

Extremidade 5′ do transcrito primário
HO OH
CH2 P P P CH2
5′
Ligação trifosfato 5′ – 5′
OH
7-metilguanosina
CH3
(B)

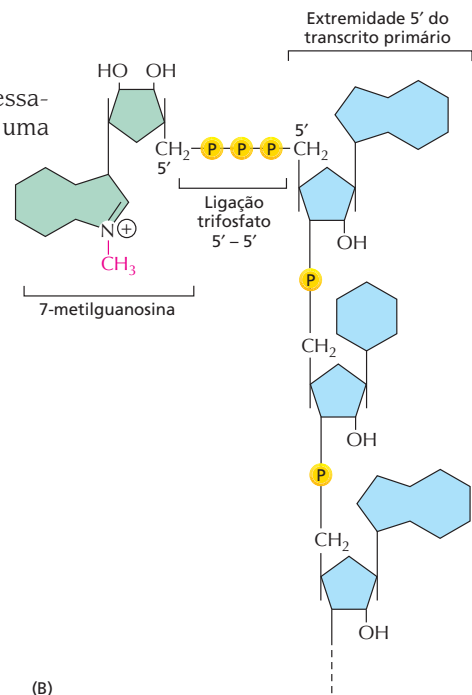
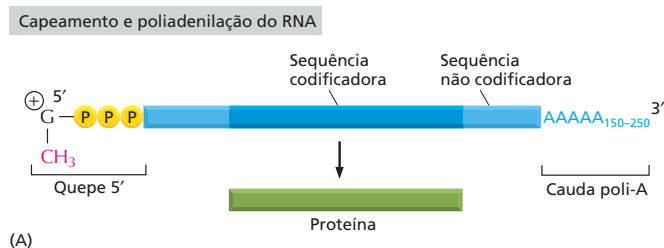
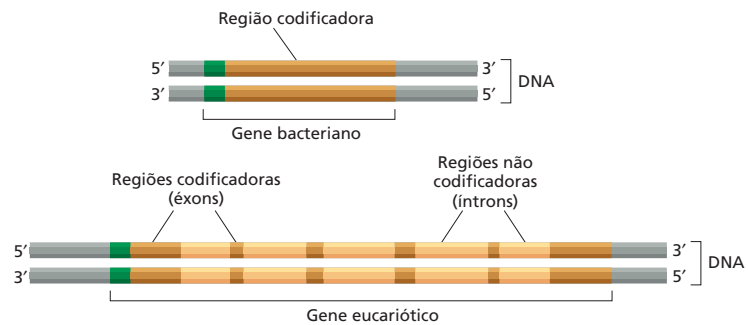



Figura 7-17 Genes eucarióticos e bacterianos são organizados de forma distinta. Um gene bacteriano consiste em uma única porção de sequência nucleotídica não interrompida que codifica a sequência de aminoácidos de uma proteína. Em contraste, as sequências codificadoras (*éxons*) da maioria dos genes em eucariotos são interrompidas por sequências não codificadoras (*íntrons*). Os promotores de transcrição estão indicados em *verde*.

modificação bem mais radical sobre o transcrito primário de RNA se comparada ao capeamento e à poliadenilação, anteriormente citados, e é o resultado de uma característica surpreendente de arranjo dos genes eucarióticos. Em bactérias, a maior parte das proteínas é codificada a partir de um segmento não interrompido da sequência de DNA, o qual é transcrito em RNA que, sem qualquer outro processamento, pode atuar como mRNA. A maioria dos genes eucarióticos, no entanto, apresenta as suas sequências codificadoras interrompidas por longas *sequências intervenientes* não codificadoras, denominadas **íntrons** (Figura 7-17). As porções esparsas de sequências codificadoras, ou *sequências expressas,* denominadas **éxons**, são geralmente mais curtas do que as sequências de íntrons, sendo a porção codificadora de um gene eucariótico frequentemente apenas uma pequena fração do comprimento total do gene. O comprimento dos íntrons varia de um único nucleotídeo a mais de 10.000 nucleotídeos. Alguns genes eucarióticos não possuem qualquer íntron, e outros possuem apenas uns poucos, mas a maioria apresenta diversos íntrons (Figura 7-18).

Os íntrons são removidos pelo *splicing* de RNA

Para produzir um mRNA em uma célula eucariótica, o gene, em sua totalidade, incluindo tanto íntrons quanto éxons, é transcrito em RNA. Após o capeamento, e conforme a RNA-polimerase continua a transcrição do gene, tem início o processo de ***splicing* do RNA**, durante o qual as sequências íntron são removidas do RNA recém-sintetizado e as sequências éxon são unidas umas às outras. Finalmente, cada transcrito recebe uma cauda poli-A; em alguns casos, essa etapa ocorre após o *splicing,* ao passo que em outros casos, essa etapa ocorre antes que as reações de *splicing* estejam completas. Se um transcrito já sofreu *splicing* e ambas as extremidades 5′ e 3′ foram modificadas, esse RNA é uma molécula funcional que pode então deixar o núcleo e ser traduzida em proteína.

Como a célula determina quais segmentos do transcrito primário serão removidos durante o *splicing?* Diferentemente da sequência codificadora de um éxon, a sequência nucleotídica da maior parte de um íntron parece não ser importante. Apesar de existir pouca semelhança, em geral, entre as sequências nucleotídicas de diferentes íntrons, cada íntron contém umas poucas sequências nucleotídicas curtas essenciais que direcionam sua remoção. Essas sequências se encontram nos limites do íntron ou próximas a eles e são idênticas ou bastante similares entre todos os íntrons (Figura 7-19). Guiada por essas sequências, uma elaborada maquinaria de *splicing* remove o íntron sob a forma de uma estrutura em "laço" (Figura 7-20) produzida a partir da reação do "A" salientado em vermelho nas Figuras 7-19 e 7-20.

Figura 7-18 Os genes humanos, em sua maioria, estão divididos em éxons e íntrons. (A) O gene da β-globina, que codifica uma das subunidades da proteína transportadora de oxigênio hemoglobina, contém 3 éxons. (B) O gene do Fator VIII codifica uma proteína (Fator VIII) que opera na via da coagulação sanguínea e contém 26 éxons. Mutações nesse grande gene são responsáveis pela forma mais prevalente de hemofilia.

Figura 7-19 Sequências especiais de nucleotídeos sinalizam o início e o final de um íntron. Apenas as sequências nucleotídicas mostradas são necessárias para a remoção de um íntron. As demais posições em um íntron podem ser ocupadas por qualquer nucleotídeo. Essas sequências especiais são reconhecidas por pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs), que clivam o RNA na interface entre íntrons-éxons e unem covalentemente os éxons. Na ilustração, R pode representar tanto um A quanto um G; Y representa tanto C quanto U; N se refere a qualquer um dos aminoácidos. O A salientado em *vermelho* forma o ponto de forquilha da alça produzida na reação de *splicing* (ver Figura 7- 20). As distâncias sobre o RNA, entre as três sequências de *splicing*, são extremamente variáveis; entretanto, a distância entre o ponto de forquilha e a junção 5′ do *splicing* é caracteristicamente muito maior do que a distância entre a junção 3′ do *splicing* e o ponto de forquilha. As sequências de *splicing* ilustradas se referem a humanos; sequências similares direcionam o *splicing* do RNA em outros organismos eucarióticos.

Apesar de não nos determos em detalhes na maquinaria do *splicing*, é importante observar que, diferentemente do que ocorre nas outras etapas de produção do mRNA que foram discutidas, o *splicing* do RNA é realizado predominantemente por moléculas de RNA, em vez de proteínas. Moléculas de RNA reconhecem os limites entre éxon-íntron (por meio de pareamento de bases por complementaridade) e participam intimamente das reações químicas do *splicing.* Essas moléculas de RNA, denominadas **pequenos RNAs nucleares (snRNAs**, de *small nuclear RNAs)* estão agregadas a proteínas adicionais para formar as *pequenas partículas ribonucleoproteicas nucleares* (*snRNPs*, de *small nuclear ribonucleoprotein particles*). Esses snRNPs formam o núcleo do **spliceossomo**, o grande arranjo de RNA e de moléculas proteicas que realiza o *splicing* na célula. Para visualizar o spliceossomo em ação, ver **Animação 7.5**.

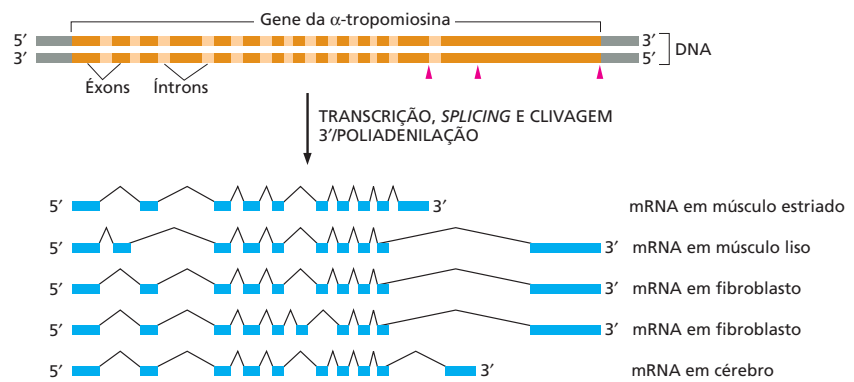
O tipo de arranjo que inclui éxons-íntrons em eucariotos pode parecer inicialmente um grande gasto desnecessário; no entanto, ele leva a consequências positivas. Em primeiro lugar, os transcritos de diversos genes eucarióticos podem ser processados por *splicing* sob diferentes formas, cada uma delas levando à produção de uma proteína distinta. Esse tipo de ***splicing* alternativo** permite, portanto, que diferentes proteínas sejam produzidas a partir de um mesmo gene (**Figura 7-21**). Estima-se que aproximadamente 60% dos genes humanos sejam capazes de realizar esse tipo de *splicing* alternativo. Dessa forma, o *splicing* do RNA permite que os eucariotos elevem astronomicamente o potencial de codificação de seus genomas.

O *splicing* do RNA também fornece outra vantagem aos eucariotos, uma que provavelmente desempenhou um papel extremamente importante na história evolutiva inicial dos genes. Como será discutido detalhadamente no Capítulo 9, acredita-se que a estruturação em éxons-íntrons tenha acelerado o surgimento de proteínas novas e úteis. A existência de íntrons longos torna a recombinação genética entre éxons de diferentes genes mais provável. Isso significa que genes para novas proteínas podem ter evoluído de forma bastante rápida por meio da combinação de segmentos de genes preexistentes, um mecanismo semelhante à montagem de um novo tipo de máquina a partir de um *kit* que contenha uma série de componentes funcionais pré-testados. Várias proteínas de células atuais se assemelham a uma colcha-de-retalhos composta a partir de um conjunto-padrão de peças proteicas, denominadas *domínios* proteicos (ver Figura 4-16).

Os mRNAs eucarióticos maduros são seletivamente exportados do núcleo

Vimos como acontecem, ordenadamente, a síntese e o processamento do mRNA eucariótico dentro do núcleo da célula. No entanto, esses eventos geram um problema específico para as células eucarióticas: do mRNA total que é sintetizado, apenas uma pequena fração – o mRNA maduro – é útil para a célula. Os fragmentos restantes de RNA – íntrons excisados, RNAs quebrados e transcritos que sofreram *splicing* de forma inadequada – não apenas são inúteis, como podem também ser perigosos para a célula se não forem destruídos. Como, então, a célula distingue entre as moléculas relativamente raras de mRNA maduro que ela necessita manter e a enorme quantidade de fragmentos gerados pelo processamento de RNA?

Figura 7-20 Um íntron forma uma estrutura ramificada durante o *splicing*. No primeiro passo, a adenina do ponto de forquilha (A em *vermelho*), na sequência do íntron, ataca o sítio 5′ de *splicing* e corta a estrutura de açúcar-fosfato do RNA nesse ponto (essa é a mesma adenina que está salientada em vermelho na Figura 7-19). A extremidade 5′ cortada do íntron se torna covalentemente ligada ao grupo 2′-OH da ribose do A formando uma estrutura ramificada. A seguir, a extremidade 3′-OH livre, da sequência do éxon, reage com a sequência inicial do éxon seguinte, o que une os dois éxons em uma sequência codificadora contínua e libera o íntron sob a forma de um laço, o qual é então degradado.

Figura 7-21 O gene da α-tropomiosina pode sofrer *splicing* de diferentes maneiras. A α-tropomiosina é uma proteína supertorcida (ver Figura 4-13) que regula a contração em células musculares. O seu transcrito primário pode sofrer *splicing* em diferentes formas, como indicado na figura, produzindo mRNAs distintos que, a seguir, darão origem a variantes proteicas. Alguns dos padrões de *splicing* são específicos de determinados tipos de células. Por exemplo, a α-tropomiosina produzida em músculo estriado é diferente daquela produzida a partir do mesmo gene na musculatura lisa. As setas *vermelhas*, na região superior da figura, representam os sítios onde a adição de poli-A pode ocorrer.

A resposta é que o transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma, onde ele será traduzido em proteína, é altamente seletivo: apenas RNAs adequadamente processados podem ser transportados. Esse acoplamento entre um processamento adequado e o transporte do RNA é mediado pelo *complexo do poro nuclear,* que reconhece e transporta apenas mRNAs finalizados. Esses poros aquosos conectam o nucleoplasma ao citosol e, como será discutido no Capítulo 15, atuam como portões que controlam quais macromoléculas podem entrar ou sair do núcleo. Para estar "pronta para a exportação", uma molécula de mRNA deve estar ligada a um conjunto apropriado de proteínas, onde todas sinalizam que o mRNA foi corretamente processado. Dentre essas proteínas podemos citar as proteínas de ligação à poli-A, um complexo de ligação ao quepe e proteínas que marcam RNAs que sofreram *splicing* total (**Figura 7-22**). É provavelmente o conjunto completo de proteínas ligadas, muito mais do que uma proteína única específica, que determina, em última instância, se uma molécula de RNA poderá deixar o núcleo. Os "RNAs lixo" que permanecem no núcleo são degradados, e suas unidades de construção são reutilizadas na transcrição.

As moléculas de mRNA são finalmente degradadas pela célula

Visto que uma única molécula de mRNA pode ser traduzida muitas vezes (ver Figura 7-2), o intervalo de tempo que uma molécula madura de mRNA permanece na célula afeta a quantidade de proteína produzida. Todas as moléculas de mRNA são finalmente degradadas em nucleotídeos por RNases celulares, mas o tempo de vida das moléculas de mRNA difere consideravelmente – dependendo da sequência nucleotídica do mRNA e do tipo de célula na qual o mRNA é produzido. A maioria dos mRNAs produzidos em bactérias é rapidamente degradada,

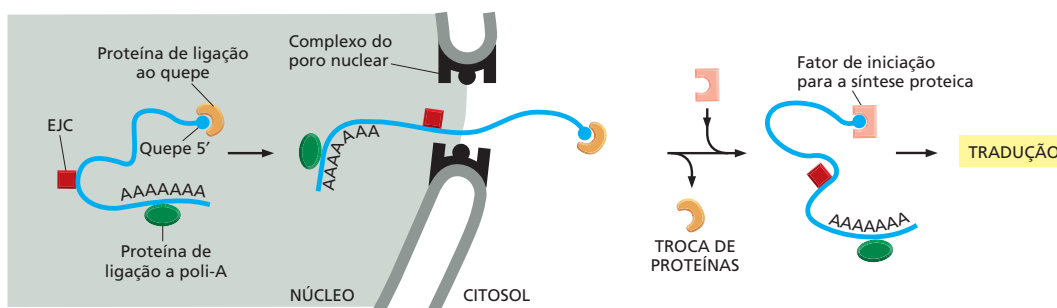



Figura 7-22 Um conjunto especializado de proteínas de ligação ao RNA sinaliza que o mRNA maduro está pronto para ser exportado para o citoplasma. Como indicado à esquerda, o quepe e a cauda poli-A de uma molécula madura de mRNA estão "marcadas" por proteínas que reconhecem essas modificações. Além disso, um grupo de proteínas denominadas *complexo de junção do éxon* (*EJC*) é depositado sobre o mRNA após o RNA ter sofrido o *splicing* adequadamente. Quando o mRNA é considerado "pronto para exportação", um receptor de transporte nuclear (discutido no Capítulo 15) se associa a ele guiando-o através do poro nuclear. Uma vez no citosol, o mRNA pode perder algumas proteínas anteriormente ligadas e adquirir outras.

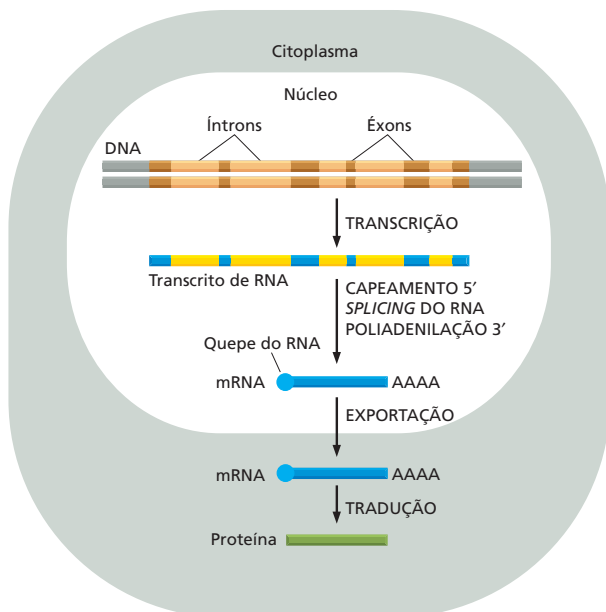
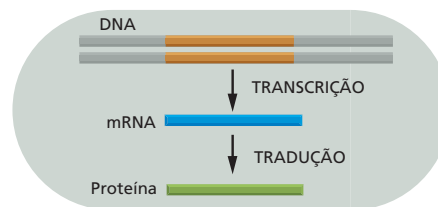
apresentando caracteristicamente um tempo médio de vida de aproximadamente 3 minutos. Os mRNAs de células eucarióticas geralmente persistem por períodos mais longos. Alguns transcritos, como aqueles que codificam a β-globina, apresentam um tempo médio de vida de mais de 10 horas, ao passo que outros mRNAs eucarióticos possuem um tempo médio inferior a 30 minutos.

Essas diferenças no tempo de vida são em parte controladas por sequências nucleotídicas que se encontram sobre o próprio mRNA, mais frequentemente na porção do RNA denominada região 3′ não traduzida, que se localiza entre a extremidade 3′ da sequência codificadora e a cauda poli-A. As diferenças na duração do mRNA auxiliam a célula a determinar a quantidade de cada proteína que é sintetizada. Em geral, proteínas produzidas em grandes quantidades, como a β-globina, são traduzidas a partir de mRNA que possuem longa duração, ao passo que aquelas proteínas presentes em baixos níveis, ou aquelas cujos níveis devem ser alterados rapidamente em resposta à sinalização, são tipicamente sintetizadas a partir de mRNAs de curta duração. Essas diferenças no tempo de vida do mRNA são o auge da sintonia fina evolutiva, em que a estabilidade dos mRNAs está atrelada às necessidades da célula.

As primeiras células devem ter possuído íntrons em seus genes

O processo de transcrição é universal: todas as células usam RNA-polimerase associada ao sistema de complementaridade de bases, para sintetizar RNA a partir de DNA. Além disso, as RNA-polimerases bacterianas e eucarióticas são praticamente idênticas em termos de estrutura geral e certamente evoluíram a partir de uma polimerase ancestral comum. É, portanto, intrigante que o transcrito resultante seja tratado de forma tão diferente em eucariotos e procariotos (**Figura 7-23**). Em particular, o *splicing* do RNA parece indicar uma diferença fundamental entre esses dois tipos de células; mas, afinal, como teve origem essa diferença tão marcante?

Como vimos, o *splicing* do RNA permite aos eucariotos a capacidade de produzir uma ampla variedade de proteínas a partir de um único gene e confere a eles um certo grau de flexibilidade evolutiva. No entanto, essas vantagens têm um custo: a célula deve manter um grande genoma e desprezar uma grande parcela do RNA que sintetiza. De acordo com uma linha de pensamento, as

Figura 7-23 Procariotos e eucariotos "manipulam" diferentemente seus transcritos de RNA. (A) Em células eucarióticas, a molécula inicial de RNA, produzida pela transcrição, contém tanto sequências de íntrons quanto de éxons. Suas duas extremidades são modificadas, e os íntrons são removidos por uma reação enzimaticamente catalisada de *splicing* do RNA. A seguir, o mRNA resultante é transportado do núcleo para o citoplasma, onde é traduzido em proteína. Apesar de esses passos estarem ilustrados como se ocorressem um de cada vez, em sequência, na realidade eles ocorrem simultaneamente. Por exemplo, o quepe do RNA é caracteristicamente adicionado, e o *splicing* inicia antes que o transcrito esteja completo. Em virtude desse acoplamento, transcritos primários completos (que incluem todos éxons e íntrons) não são geralmente encontrados nas células. (B) Em procariotos, a produção de moléculas de mRNA é mais simples. A extremidade 5′ de uma molécula de RNA é produzida na iniciação da transcrição pela RNA-polimerase, e a extremidade 3′ é produzida pelo término da transcrição. Visto que células procarióticas não possuem núcleo, a transcrição e a tradução ocorrem em um mesmo compartimento. Assim, a tradução de um mRNA bacteriano tem início antes que sua síntese esteja completa. A quantidade de proteína em uma célula depende da eficiência de cada um desses passos e da taxa de degradação das moléculas de RNA e proteína.

células primordiais – os ancestrais comuns de procariotos e eucariotos – continham íntrons que foram perdidos pelos procariotos ao longo de sua evolução subsequente. Pelo abandono de seus íntrons e adoção de um genoma menor, mais fluido, os procariotos foram capazes de se reproduzir mais rápida e eficientemente. Corroborando essa ideia, eucariotos simples que se reproduzem rapidamente (p. ex., algumas leveduras) possuem relativamente poucos íntrons, e esses íntrons são em geral muito menores do que aqueles encontrados em eucariotos superiores.

Por outro lado, alguns argumentam que os íntrons se originaram a partir de elementos genéticos móveis parasitas (discutidos no Capítulo 6) que invadiram um ancestral eucariótico primordial e colonizaram seu genoma. Essas células hospedeiras então, inadvertidamente, replicaram esses fragmentos egoístas de nucleotídeos junto a seu próprio DNA, e os eucariotos modernos nunca se preocuparam em eliminar ou arrumar a bagunça genética deixada por essas infecções ancestrais. A questão, no entanto, está longe de ser definida; se os íntrons evoluíram no início – e foram perdidos pelos procariotos – ou evoluíram tardiamente nos eucariotos, é uma questão atual de debate científico, sobre a qual retornaremos no Capítulo 9.

DO RNA À PROTEÍNA

No final da década de 1950, os biólogos haviam demonstrado que a informação codificada no DNA era inicialmente copiada em RNA e a seguir em proteína. O debate estava centrado no "problema da codificação": como uma informação sob a forma de uma sequência linear de nucleotídeos no RNA era traduzida para a forma de uma sequência linear de um conjunto de subunidades quimicamente tão distintas – os aminoácidos das proteínas? Essa fascinante questão excitou e estimulou enormemente os cientistas da época. Esse era um quebra-cabeça proposto pela natureza que, após mais de 3 bilhões de anos de evolução, poderia ser resolvido por um dos produtos dessa evolução – os seres humanos! E foi o que aconteceu, não apenas o código foi finalmente decifrado e compreendido em nível molecular, como foram também estabelecidas as principais características da maquinaria por meio da qual as células leem esse código.

Uma sequência de mRNA é decodificada em grupos de três nucleotídeos

A transcrição como forma de transferência de informação é simples de compreender, visto que o DNA e o RNA são química e estruturalmente similares, e o DNA pode atuar diretamente como molde para a síntese de RNA pelo sistema de pareamento de bases por complementaridade. Como o termo transcrição diz, é como se uma mensagem manuscrita estivesse sendo convertida, digamos, em um texto datilografado. A linguagem *per se* e a forma da mensagem não foram alteradas, e os símbolos utilizados são bastante semelhantes.

Em contraste, a conversão da informação contida no RNA para proteína representa uma **tradução** da informação em outra linguagem, composta por símbolos bastante diferentes. Visto existirem apenas quatro nucleotídeos diferentes no mRNA, mas 20 tipos diferentes de aminoácidos em uma proteína, essa tradução não pode acontecer por um sistema de correspondência direto entre um nucleotídeo no RNA e um aminoácido na proteína. As regras que ditam como uma sequência de nucleotídeos de um gene, por intermédio do mRNA, é traduzida em uma sequência de aminoácidos de uma proteína são conhecidas sob a denominação de **código genético**.

A sequência de nucleotídeos na molécula de mRNA é lida, consecutivamente, em grupos de três. Visto que o RNA é um polímero linear constituído de quatro diferentes nucleotídeos, existem $4 \times 4 \times 4 = 64$ combinações possíveis de três nucleotídeos: AAA, AUA, AUG, e assim por diante. No entanto, apenas 20 aminoácidos são geralmente encontrados em proteínas. Dessa forma, ou

	AGA									UUA					AGC					
	AGG									UUG					AGU					
GCA	CGA						GGA			CUA				CCA	UCA	ACA			GUA	
GCC	CGC						GGC		AUA	CUC				CCC	UCC	ACC			GUC	UAA
GCG	CGG	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA	GGG	CAC	AUC	CUG	AAA		UUC	CCG	UCG	ACG		UAC	GUG	UAG
GCU	CGU	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG	GGU	CAU	AUU	CUU	AAG	AUG	UUU	CCU	UCU	ACU	UGG	UAU	GUU	UGA
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	terminação
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	

Figura 7-24 A sequência nucleotídica de um mRNA é traduzida para a sequência de aminoácidos de uma proteína pelo uso de um código genético. Todos os códons de três nucleotídeos que determinam um dado aminoácido estão listados sobre esse aminoácido, o qual está representado tanto pela abreviação-padrão de uma letra quanto pela abreviação em sigla de três letras (ver Painel 2-5, p. 72-73 para o nome completo de cada aminoácido e a sua estrutura). Por convenção, os códons são sempre escritos com o nucleotídeo 5′-terminal à esquerda. Observe que a maioria dos aminoácidos é representada por mais de um códon e que existem algumas regularidades no conjunto de códons que especificam cada aminoácido. Códons para o mesmo aminoácido contêm, em geral, os mesmos nucleotídeos na primeira e na segunda posições e podem variar em sua terceira posição. Existem três códons que não especificam aminoácidos, mas atuam como sítios de terminação (códons de terminação), sinalizando o final da sequência codificadora de proteína. Um códon – AUG – age tanto como códon de iniciação, sinalizando o início de uma mensagem que codifica para uma proteína, quanto como códon que especifica metionina.

alguns tripletes de nucleotídeos nunca são usados, ou o código é redundante e alguns aminoácidos são especificados por mais de um triplete. Essa segunda possibilidade é, de fato, a correta, como ilustrado pelo código genético totalmente decifrado representado na **Figura 7-24**. Cada grupo de três nucleotídeos consecutivos sobre o RNA é denominado **códon**, e cada um desses especifica um aminoácido. A estratégia utilizada para decifrar esse código está descrita no item **Como Sabemos**, p. 248-249.

O código genético ilustrado na Figura 7-24 é usado por praticamente todos os organismos da atualidade. Apesar de umas poucas diferenças no código terem sido descritas, essas ocorrem principalmente no DNA mitocondrial e em alguns fungos e protozoários. A mitocôndria possui sua própria maquinaria de transcrição e síntese proteica, que opera de forma bastante independente da maquinaria celular propriamente dita (discutida no Capítulo 14), e foi, portanto, capaz de acomodar pequenas alterações sobre esse código, que, no restante, é universal. Mesmo no caso de fungos e protozoários, as similaridades do código são muito superiores às poucas diferenças.

Em princípio, uma sequência de RNA pode ser traduzida em qualquer uma de três **fases de leitura** diferentes, dependendo do ponto de início do processo de decodificação (**Figura 7-25**). No entanto, apenas uma das três possíveis fases de leitura sobre um mRNA codifica a proteína correta. Veremos, em uma seção posterior, como um sinal pontual específico no início de cada mensagem de RNA posiciona corretamente a fase de leitura.

Figura 7-25 Uma molécula de RNA pode ser traduzida em três fases de leitura diferentes. No processo de tradução de uma sequência nucleotídica (*azul*) em uma sequência de aminoácidos (*vermelho*), a sequência de nucleotídeos na molécula de mRNA é lida da extremidade 5′ para a 3′ em grupos sequenciais de três nucleotídeos. Em princípio, portanto, a mesma sequência de RNA pode determinar três sequências completamente diferentes de aminoácidos, dependendo da fase de leitura. Entretanto, apenas umas das três fases de leitura contém a mensagem real.

As moléculas de tRNA transportam os aminoácidos para os códons no mRNA

Os códons de uma molécula de mRNA não reconhecem diretamente os aminoácidos por eles codificados: o grupo de três nucleotídeos não se liga diretamente ao aminoácido, por exemplo. Em vez disso, a tradução do mRNA em proteína depende de moléculas adaptadoras que podem reconhecer e ligar-se ao códon por um sítio sobre sua superfície e ao aminoácido por um outro sítio. Esses adaptadores consistem em um conjunto de pequenas moléculas de RNA conhecidas como **RNAs transportadores** (**tRNAs**), cada uma com aproximadamente 80 nucleotídeos de comprimento.

Vimos que uma molécula de RNA pode dobrar-se adquirindo uma estrutura tridimensional, por meio de pareamento de bases entre diferentes regiões da molécula. Se as regiões pareadas são suficientemente extensas, formarão uma estrutura em dupla-hélice, semelhante à estrutura de uma fita dupla do DNA. As moléculas de tRNA fornecem o exemplo mais impressionante desse fenômeno. Quatro pequenos segmentos de tRNA adquirem estrutura dupla-hélice, produzindo uma molécula que se assemelha a uma folha de trevo quando desenhada esquematicamente (**Figura 7-28A**). Por exemplo, a sequência 5′-GCUC-3′ em uma porção da

COMO SABEMOS:
DECIFRANDO O CÓDIGO GENÉTICO

No início da década de 1960, o *dogma central* havia sido aceito como representativo da via através da qual a informação fluía do gene para a proteína. Estava claro que os genes codificavam proteínas, que os genes eram feitos de DNA e que o mRNA funcionava como um intermediário, transportando a informação do núcleo – onde o DNA está estocado – para o citoplasma, onde acontece a tradução das proteínas.

Até mesmo o formato geral do código genético estava compreendido: cada um dos 20 aminoácidos encontrados nas proteínas é representado por um códon (triplete) sobre uma molécula de mRNA. No entanto, um desafio ainda maior permanecia: biólogos, químicos e mesmo físicos concentravam seus esforços buscando a quebra do código – tentando desvendar qual aminoácido era codificado por cada um dos 64 possíveis tripletes de nucleotídeos. A via mais segura para a solução dessa questão seria a comparação da sequência de um segmento de DNA ou mRNA com seu produto polipeptídico correspondente. No entanto, as técnicas de sequenciamento de ácidos nucleicos só ficariam disponíveis no final da década de 1960.

Assim, os cientistas decidiram que, para decifrar o código genético, eles teriam de sintetizar suas próprias mensagens simples. Se eles pudessem direcionar essas moléculas para os ribossomos – as máquinas produtoras de proteínas – e a seguir analisar o produto proteico resultante, então estariam no rumo certo em relação à compreensão dos tripletes que correspondiam aos aminoácidos.

Abandonando as células

Antes de os pesquisadores começarem a preparar seus mRNAs sintéticos, eles teriam de aperfeiçoar um sistema livre de células para a síntese de proteínas. Isso permitiria que eles traduzissem as mensagens em polipeptídeos dentro de tubos de ensaio. (De modo geral, quando se trabalha em laboratório, quanto mais simples o sistema utilizado, mais claros e fáceis de interpretar são os resultados.) Para isolar a maquinaria molecular que necessitavam para um dado sistema de tradução livre de células, os pesquisadores disrupcionaram células de *E. coli* e colocaram o seu conteúdo em uma centrífuga. A centrifugação dessas amostras, em alta velocidade, fazia com que as membranas e outros grandes fragmentos celulares fossem levados para o fundo do tubo; os componentes celulares necessários para a síntese de proteínas, mais leves – como mRNA, tRNA, ribossomos, enzimas e outras moléculas pequenas –, permaneciam em suspensão no sobrenadante. Os pesquisadores descobriram que a simples adição de aminoácidos radioativos a essa "sopa" celular poderia induzir a produção de proteínas radiomarcadas. Por meio de uma nova centrifugação desse sobrenadante, sob uma velocidade um pouco maior, era possível forçar a deposição de ribossomos e dos peptídeos recém-sintetizados no fundo do tubo; os polipeptídeos marcados podiam então ser detectados pela medida da radioatividade remanescente no sedimento do tubo após descarte da fase aquosa superior.

O problema desse sistema em particular era que ele produzia as proteínas codificadas pelos mRNAs celulares que já estavam presentes no extrato, e os pesquisadores queriam usar suas próprias mensagens sintéticas para direcionar a síntese de proteínas. Esse problema foi resolvido quando Marshall Nirenberg descobriu que poderia destruir RNA celular no extrato pela adição de uma pequena quantidade de ribonuclease – uma enzima que degrada RNA. A partir desse ponto, a próxima etapa era a produção de grandes quantidades da mensagem que ele adicionaria, a colocação desse mRNA sintético sobre o sistema livre de células e a análise dos peptídeos resultantes.

Falsificando a mensagem

A produção de polinucleotídeos com uma sequência definida não foi tão simples como se pretendia. Novamente, seriam necessários anos antes que os químicos desenvolvessem as técnicas que pudessem ser utilizadas para a síntese de uma fita definida de nucleotídeos. Nirenberg decidiu utilizar a polinucleotídeo-fosforilase, uma enzima que unia ribonucleotídeos entre eles, sem a presença de um molde. Assim, a sequência de RNA resultante dependeria exclusivamente dos nucleotídeos que estivessem disponíveis para a enzima. Uma mistura de nucleotídeos seria sintetizada formando uma sequência absolutamente aleatória; mas se um único nucleotídeo estivesse presente, o resultado seria uma fita polimérica contendo esse único nucleotídeo. Assim, Nirenberg, em associação com seu colaborador Heinrich Matthaei, produziu inicialmente um mRNA composto inteiramente de uracila – poli-U.

A seguir, esses pesquisadores colocaram esse poli-U sobre o sistema de tradução livre de células. Eles então adicionaram aminoácidos radioativamente marcados sobre a mistura. Após testarem cada aminoácido – um de cada vez, em 20 experimentos diferentes –, eles determinaram que o poli-U induzia a síntese de um peptídeo que continha apenas fenilalanina (**Figura 7-26**). Visto que UUU é o único códon triplete possível nessa mensagem, eles chegaram à conclusão que UUU codificava fenilalanina. A primeira palavra do código genético havia sido decifrada.

Nirenberg e Matthaei repetiram esse experimento com poli-A e poli-C e determinaram que AAA codificava lisina e CCC codificava prolina. O significado do poli-G não pode ser determinado por esse método, pois esse polinucleotídeo formava uma estranha hélice-fita tripla que não conseguia ser utilizada como molde no sistema livre de células.

Alimentar ribossomos com mRNAs sintéticos parecia uma técnica bastante interessante. No entanto, as possibilidades de uso de um único nucleotídeo estavam exauridas, e os pesquisadores haviam definido três códons, restando ainda 61 possibilidades. As outras combinações de códons, no entanto, eram mais difíceis de serem construídas, e uma nova abordagem de síntese seria necessária. Na década de 1950, o químico orgânico Gobind Khorana havia desenvolvido métodos de preparo de misturas polinucleotídicas com sequência definida – mas essa técnica funcionava apenas com DNA. Quando ficou sabendo do trabalho de Nirenberg com mensagens sintéticas, Khorana redirecionou sua capacidade e esforço de trabalho para a produção de RNAs. Ele descobriu que se fizesse DNAs com uma sequência definida, poderia, a seguir, utilizar uma RNA-polimerase para

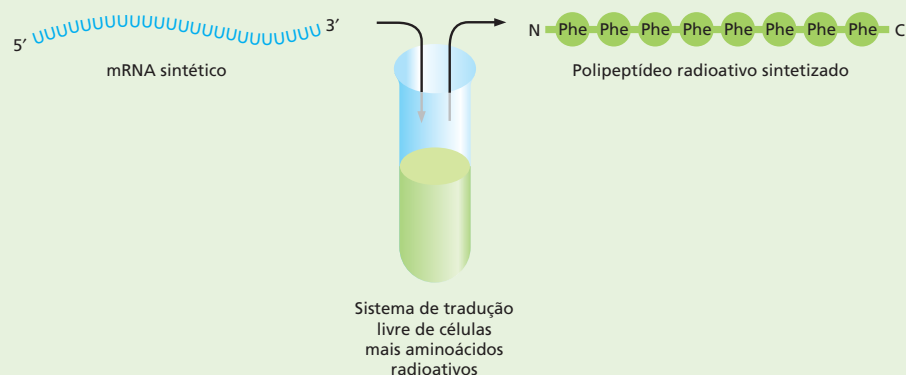



Figura 7-26 **UUU codifica uma fenilalanina.** mRNAs sintéticos são adicionados em um sistema de tradução livre de células que contém ribossomos, tRNAs, enzimas e outras moléculas pequenas. Aminoácidos radioativos são adicionados a essa mistura, e os polipeptídeos resultantes são analisados. Nesse caso, é demonstrado que um poli-U codifica um polipeptídeo que contém apenas fenilalanina.

produzir os RNAs a partir desses DNAs. Dessa forma, Khorana preparou uma coleção de diferentes mRNAs contendo uma sequência repetitiva definida. Ele gerou sequências repetitivas de dinucleotídeos (como poli-UC), trinucleotídeos (como poli-UUC) e de tetranucleotídeos (como poli-UAUC).

Entretanto, esses polinucleotídeos geraram resultados muito mais difíceis de analisar do que os gerados pelas sequências mononucleotídicas utilizadas por Nirenberg. Vejamos, por exemplo, a poli-UG. Quando esse dinucleotídeo é adicionado a um sistema de tradução, os pesquisadores podem observar que ele gera um polipeptídeo de resíduos cisteína e valina alternados. Esse RNA contém, obviamente, dois códons alternados diferentes: UGU e GUG. Dessa forma, os pesquisadores podiam dizer que UGU e GUG codificavam cisteína e valina; no entanto, eram incapazes de definir exatamente quem codificava o quê. Assim, essas mensagens mistas forneceram informações úteis, mas não revelaram definitivamente quais códons especificavam quais aminoácidos (**Figura 7-27**).

Aprisionando os tripletes

Essas ambiguidades no código foram resolvidas quando Nirenberg e um jovem estudante de medicina chamado Phil Leder descobriram que fragmentos de RNA de apenas três nucleotídeos de comprimento – o tamanho de um único códon – podiam ligar-se a um ribossomo e atrair a molécula adequada de tRNA carregada para a maquinaria de síntese de proteína. Esses complexos – contendo um ribossomo, um códon mRNA e um tRNA-aminoacil radiomarcado – podiam então ser capturados em um filtro de papel, sendo o aminoácido identificado a seguir.

Seu teste-piloto feito com UUU – a primeira palavra definida – funcionou maravilhosamente. Leder e Nirenberg carregaram o sistema tradicional de tradução livre de células com fragmentos UUU. Esses trinucleotídeos se ligaram aos ribossomos, e tRNA-Phe se ligaram ao UUU. O novo sistema estava pronto, funcionava, e os pesquisadores haviam confirmado que UUU codificava fenilalanina.

Só restava aos pesquisadores produzir todos os 64 possíveis códons – uma tarefa rapidamente realizada tanto no laboratório de Nirenberg quanto de Khorana. Visto que esses pequenos trinucleotídeos eram muito mais simples de ser sintetizados quimicamente e que os testes de aprisionamento de tripletes eram de aplicação e análise bem mais fáceis do que os experimentos anteriores de decodificação, os pesquisadores foram capazes de decifrar o código genético completo no decorrer do ano seguinte.

MENSAGEM	PEPTÍDEOS PRODUZIDOS	CORRELAÇÃO DE CÓDONS
Poli-UG	...Cys–Val–Cys–Val...	UGU, GUG – Cys, Val*
Poli-AG	...Arg–Glu–Arg–Glu...	AGA, GAG – Arg, Glu
Poli-UUC	...Phe–Phe–Phe... + ...Ser–Ser–Ser... + ...Leu–Leu–Leu...	UUC, UCU, CUU – Phe, Ser, Leu
Poli-UAUC	...Tyr–Leu–Ser–Ile...	UAU, CUA, UCU, AUC – Tyr, Leu, Ser, Ile

* Um códon determina Cys, o outro, Val. A mesma ambiguidade existe nas outras determinações de códons aqui ilustradas.

Figura 7-27 **Mensagens de sequências repetitivas mistas restringiram ainda mais as possibilidades de codificação.** Apesar de essas mensagens mistas revelarem a composição dos peptídeos codificados, elas não permitem a correlação exata de um único códon para um aminoácido específico. Por exemplo, no caso de poli-UG, o experimento não possibilita distinguir, entre UGU e GUG, o códon que codifica cisteína. Como indicado, a mesma ambiguidade existe em experimentos que utilizam di, tri e tetranucleotídeos.

cadeia polinucleotídica pode formar uma associação relativamente forte com a sequência 5′-GAGC-3′ presente em outra região da mesma molécula. A folha de trevo sofre outros dobramentos, originando uma estrutura compacta em forma de L que se mantém por pontes de hidrogênio adicionais entre as diferentes regiões da molécula (ver Figura 7-28B e C).

Duas regiões nucleotídicas não pareadas situadas cada uma em uma das extremidades da molécula estruturada em L são essenciais para o funcionamento do tRNA durante a síntese proteica. Uma dessas regiões forma o **anticódon**, um conjunto de três nucleotídeos consecutivos que sofre pareamento com o códon complementar sobre a molécula de um mRNA. A outra é uma região curta, de fita simples, que se situa na extremidade 3′ da molécula; esse é o sítio onde o aminoácido que é codificado pelo códon se liga ao tRNA.

Vimos na seção anterior que o código genético é redundante; ou seja, vários códons diferentes podem determinar um mesmo aminoácido (ver Figura 7-24). Essa redundância implica que ou existe mais de um tRNA para muitos dos aminoácidos ou que algumas moléculas de tRNA podem ligar-se por complementaridade de bases a mais de um códon. Na verdade, ambas as situações ocorrem. Alguns aminoácidos possuem mais de um tRNA e alguns tRNAs são construídos de tal forma que eles exigem um pareamento de bases exato apenas às duas primeiras posições do códon, podendo tolerar um pareamento inexato (ou *oscilação)* sobre a terceira posição. Esse pareamento oscilante pode explicar por que tantos dentre os códons alternativos de um aminoácido diferem apenas em seus nucleotídeos da terceira posição (ver Figura 7-24). Os pareamentos oscilantes fazem com que seja possível adaptar os 20 aminoácidos a seus 61 códons com apenas 31 tipos diferentes de moléculas de tRNA. O número exato de diferentes tipos de tRNA, entretanto, difere entre as espécies. Por exemplo, humanos possuem quase 500 diferentes genes de tRNA, mas, entre esses, apenas 48 anticódons estão representados.

5′ GCGGAUUUAGCUCAGDDGGGAGAGCGCCAGACUGAAYAΨCUGGAGGUCCUGUGTΨCGAUCCACAGAAUUCGCACCA 3′

Anticódon

(D)

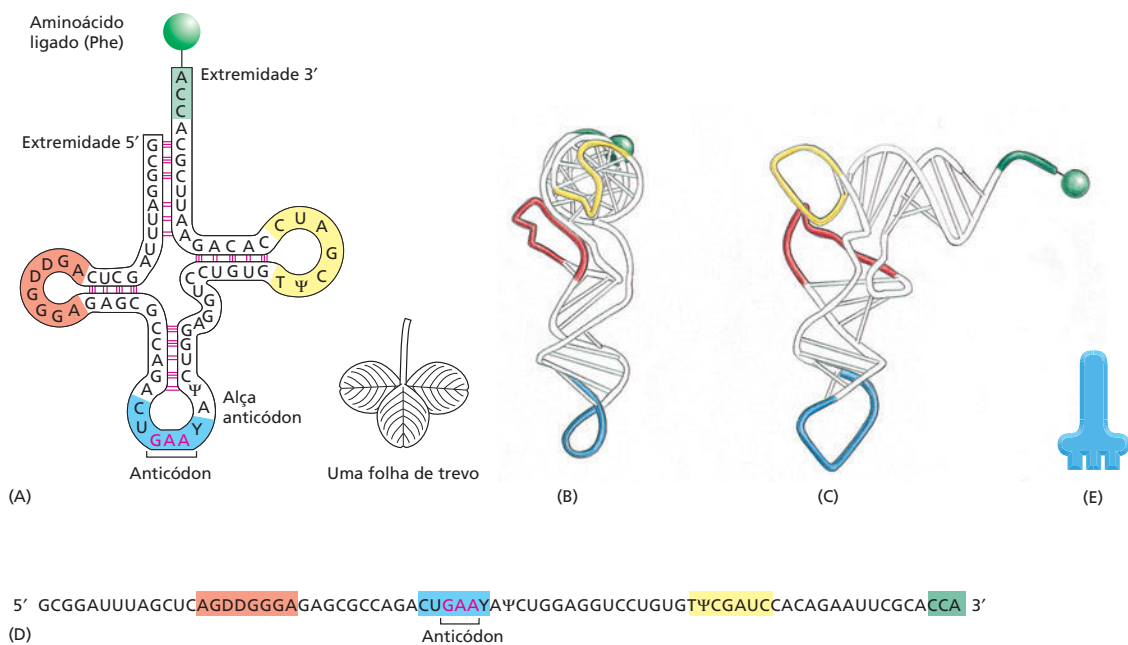



Figura 7-28 Moléculas de tRNA são adaptadores moleculares, que conectam os aminoácidos aos códons. Nessa série de diagramas, a mesma molécula de tRNA – neste caso, um tRNA específico para o amino ácido fenilalanina (Phe) – é ilustrada sob diferentes representações. (A) A estrutura em forma de folha de trevo, uma convenção utilizada para mostrar a complementaridade do pareamento de bases (*linhas vermelhas*) que cria as regiões de dupla-hélice na molécula. O anticódon (*vermelho*) é a sequência de três nucleotídeos que forma pares de bases com o códon no mRNA. O aminoácido correspondente ao par códon-anticódon está ligado à extremidade 3′ do tRNA. Os tRNAs contêm algumas bases não usuais, as quais são produzidas por alterações químicas após a síntese do tRNA. As bases identificadas como ψ (de pseudouridina) e D (de di-hidrouridina) são derivadas da uracila. (B e C) Vistas da molécula real em forma de L, com base em análise de difração de raio X. Essas imagens apresentam um ângulo de rotação de 90°, uma em relação à outra. (D) A sequência nucleotídica linear da molécula, colorida de acordo com A, B e C. (E) Representação esquemática do tRNA que será usada nas próximas figuras e que enfatiza o anticódon.

Figura 7-29 O código genético é traduzido por meio de dois adaptadores que atuam um após o outro. O primeiro adaptador é a aminoacil-tRNA-sintetase, que une um aminoácido específico ao seu tRNA correspondente; esse processo de acoplamento é denominado carregamento. O segundo adaptador é a própria molécula de tRNA, cujo anticódon forma pares de bases com o códon apropriado no mRNA. Um tRNA acoplado a seu aminoácido é também denominado tRNA carregado. Um erro em qualquer desses passos – no carregamento ou na ligação do tRNA carregado ao seu códon – provocará a incorporação de um aminoácido errado na cadeia de proteína. Na sequência de eventos ilustrada, o aminoácido triptofano (Trp) é selecionado pelo códon UGG no mRNA.

As enzimas específicas acoplam os tRNAs aos aminoácidos corretos

Com o objetivo de ler o código genético que se encontra sob a forma de DNA, as células produzem vários tRNAs diferentes. Agora, consideraremos como cada molécula de tRNA se torna *carregada* – ligada ao aminoácido que, dentre os 20 disponíveis, é seu companheiro mais adequado. O reconhecimento e a ligação do aminoácido correto é dependente de enzimas denominadas **aminoacil-tRNA sintetases**, que acoplam covalentemente cada aminoácido ao seu conjunto adequado de moléculas de tRNA. Na maioria dos organismos, existe uma enzima sintetase diferente para cada aminoácido (ou seja, existem no total 20 sintetases). Uma dessas acopla glicina a todos os tRNAs que reconhecem códons de glicina, outra acopla fenilalanina a todos os tRNAs que reconhecem códons de fenilalanina, e assim por diante. Nucleotídeos específicos, tanto no anticódon quanto no braço aceptor de aminoácidos, permitem que o tRNA correto seja reconhecido pela enzima sintetase (**Animação 7.6**). As sintetases são tão importantes quanto os tRNAs no processo de decodificação, pois é a ação combinada de sintetases e tRNAs que permite que cada códon presente sobre a molécula de mRNA promova a associação do aminoácido adequado (**Figura 7-29**).

A reação catalisada por sintetases que acopla o aminoácido à extremidade 3′ do tRNA é uma das várias reações celulares acopladas à hidrólise de ATP liberadora de energia (ver Figura 3-30), produzindo uma ligação de alta energia entre o tRNA carregado e o aminoácido. A energia dessa ligação é usada em um estágio posterior da síntese proteica para ligar covalentemente o aminoácido à cadeia polipeptídica em crescimento.

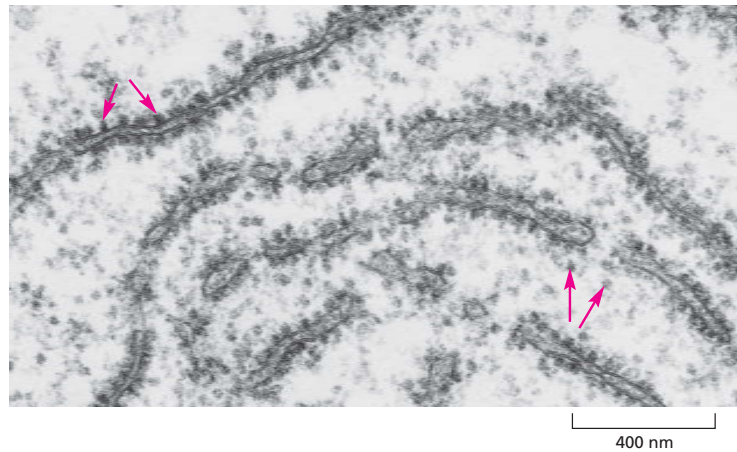
A mensagem do RNA é decodificada nos ribossomos

O reconhecimento de um códon pelo anticódon presente sobre uma molécula de tRNA depende do mesmo tipo de pareamento de bases por complementaridade usado na replicação do DNA e na transcrição. No entanto, a rápida e exata tradução do mRNA em proteínas requer uma maquinaria molecular grande que deslize sobre a cadeia de mRNA, capturando as moléculas de tRNA complementares, colocando-as em posição e ligando covalentemente os aminoácidos que elas carregam para que seja formada a cadeia proteica. Essa máquina produtora de proteínas é o **ribossomo** – um grande complexo composto por mais de 50 diferentes tipos de proteínas (as *proteínas ribossomais*) e diversas moléculas de RNA denominadas **RNAs ribossomais** (**rRNAs**). Uma célula típica contém milhões de ribossomos em seu citoplasma (**Figura 7-30**).

Os ribossomos eucarióticos e procarióticos são bastante similares, tanto em sua estrutura quanto em seu funcionamento. Ambos são compostos por uma subunidade grande e uma subunidade pequena que se encaixam para a formação do ribossomo completo, o qual possui uma massa de vários milhões

QUESTÃO 7-4

Em um inteligente experimento realizado em 1962, uma cisteína já associada ao seu tRNA foi quimicamente convertida em alanina. Essas moléculas tRNA “híbridas” foram adicionadas a um sistema de tradução livre de células do qual tRNAs-cisteína normais haviam sido removidos. Quando a proteína resultante foi analisada, determinou-se que havia sido inserida alanina em todos os pontos da cadeia proteica onde deveria existir uma cisteína. Discuta o que esse experimento nos revela sobre a função das aminoacil-tRNA-sintetases na tradução normal do código genético.

Figura 7-30 Ribossomos são encontrados no citoplasma de uma célula eucariótica. Essa microfotografia eletrônica mostra uma fina secção de uma pequena região do citoplasma. Os ribossomos aparecem como pontos pretos (setas *vermelhas*). Alguns estão livres no citosol; outros estão ligados a membranas do retículo endoplasmático. (Cortesia de George Palade.)

de dáltons (**Figura 7-31**); para comparação, uma proteína de tamanho médio possui uma massa igual a 30.000 dáltons. A subunidade pequena pareia os tRNAs aos códons do mRNA, ao passo que a subunidade grande catalisa a formação das ligações peptídicas que unem os aminoácidos uns aos outros, formando a cadeia polipeptídica. As duas subunidades se associam sobre uma molécula de mRNA, geralmente próximo a seu início (a extremidade 5'), para que seja iniciada a síntese de uma proteína. Conforme o mRNA se move através do ribossomo, este traduz a sequência nucleotídica em uma sequência de aminoácidos, um códon por vez, usando os tRNAs como adaptadores. Dessa forma, cada aminoácido é adicionado, na ordem correta, à extremidade da cadeia polipeptídica em crescimento (**Animação 7.7**). Finalmente, as duas subunidades do ribossomo se

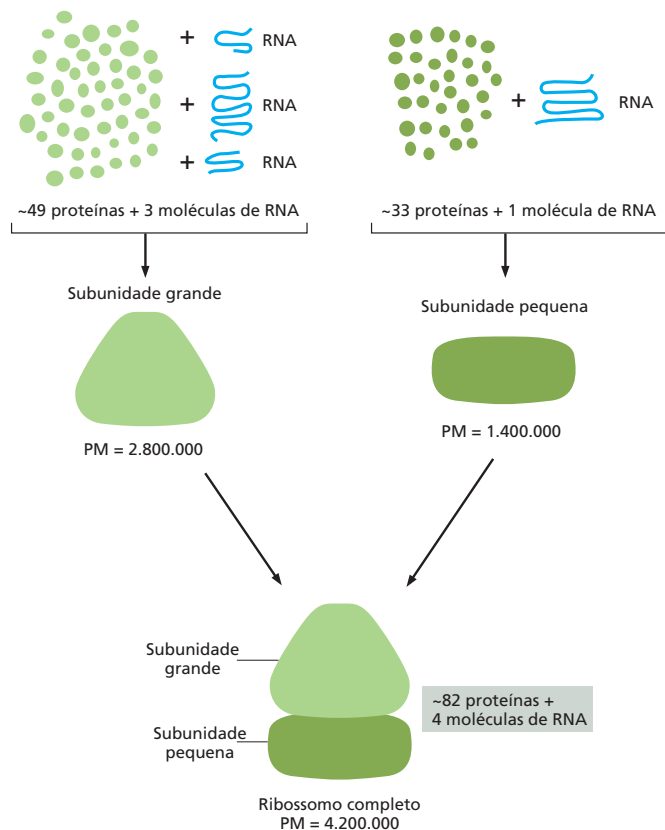



Figura 7-31 Um ribossomo é um grande complexo de quatro RNAs e mais de 80 proteínas. Estão ilustrados os componentes de ribossomos eucarióticos. Ribossomos procarióticos são bastante semelhantes. Apesar de as proteínas estarem em número muito superior aos RNAs ribossomais, os RNAs são responsáveis por mais de metade da massa do ribossomo.

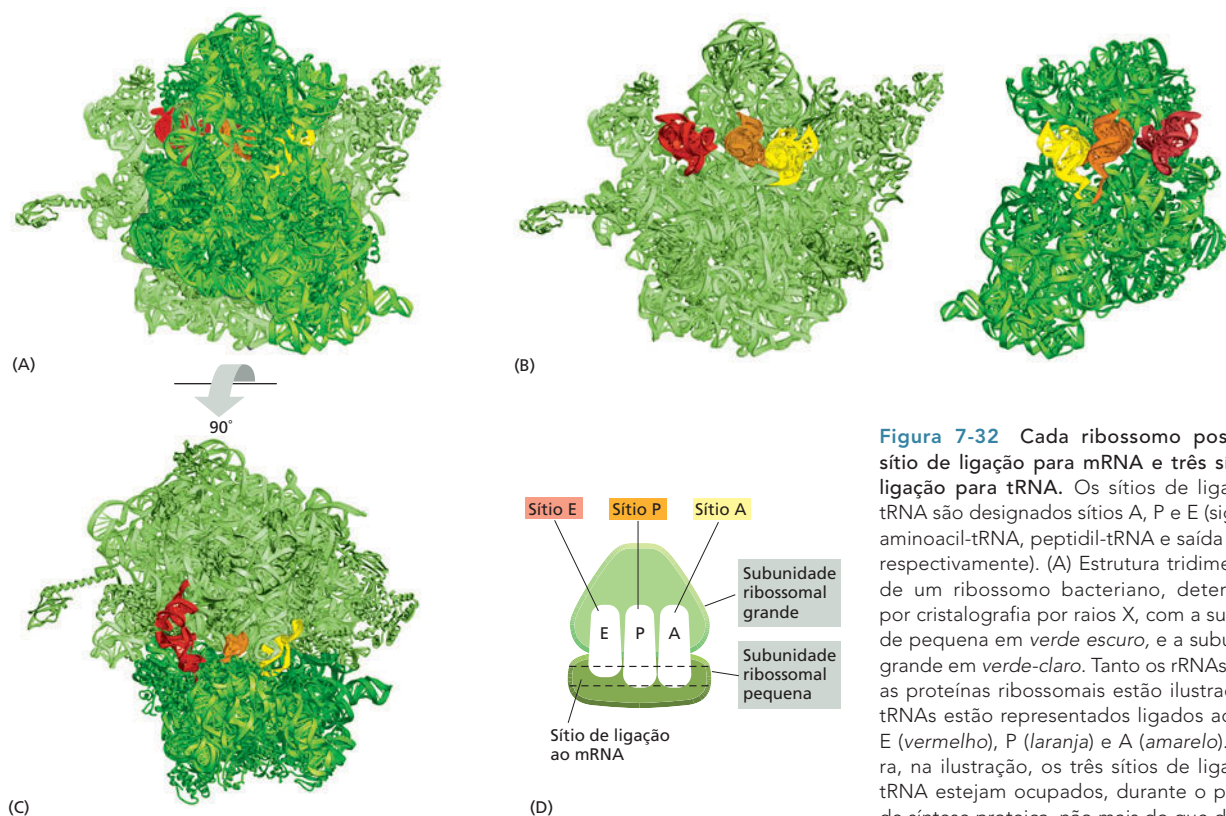



Figura 7-32 Cada ribossomo possui um sítio de ligação para mRNA e três sítios de ligação para tRNA. Os sítios de ligação ao tRNA são designados sítios A, P e E (sigla para aminoacil-tRNA, peptidil-tRNA e saída de *exit*, respectivamente). (A) Estrutura tridimensional de um ribossomo bacteriano, determinada por cristalografia por raios X, com a subunidade de pequena em *verde escuro*, e a subunidade grande em *verde-claro*. Tanto os rRNAs quanto as proteínas ribossomais estão ilustrados. Os tRNAs estão representados ligados aos sítios E (*vermelho*), P (*laranja*) e A (*amarelo*). Embora, na ilustração, os três sítios de ligação de tRNA estejam ocupados, durante o processo de síntese proteica, não mais do que dois desses sítios contêm moléculas de tRNA simultaneamente (ver Figura 7-33). (B) A estrutura das subunidades ribossomais grande (*esquerda*) e pequena (*direita*), como provavelmente se organizam no ribossomo em (A), foi aberta como um livro. (C) Estrutura do ribossomo em (A) visto de cima. (D) Representação bastante esquemática de um ribossomo (na mesma orientação de C), que será utilizada nas figuras subsequentes. (A, B, e C, adaptada de M.M.Yusupov *et al.*, *Science* 292: 883-896, 2001, com permissão de AAAS. Cortesia de Albion Bausom e Harry Noller.)

separam quando a síntese proteica está terminada. Os ribossomos operam por um sistema incrivelmente eficiente; em um intervalo de um segundo, um ribossomo de uma célula eucariótica adiciona aproximadamente dois aminoácidos à cadeia polipeptídica. Ribossomos bacterianos operam ainda mais rapidamente, sob uma taxa de cerca de 20 aminoácidos por segundo.

Como os ribossomos conseguem orquestrar todos os movimentos necessários para a tradução? Cada ribossomo contém um sítio de ligação para a molécula de mRNA e três sítios de ligação para moléculas de tRNA, denominados sítio A, sítio P e sítio E (**Figura 7-32**). Para adicionar um aminoácido à cadeia polipeptídica em crescimento, o tRNA adequadamente carregado penetra no sítio A por pareamento de bases com o códon complementar que se encontra na molécula de mRNA. Seu aminoácido é então ligado à cadeia polipeptídica que está associada ao tRNA presente no sítio P vizinho a ele. A seguir, o ribossomo se movimenta, e o tRNA vazio é posicionado sobre o sítio E antes de ser ejetado (**Figura 7-33**). Esse ciclo de reações é repetido cada vez que um aminoácido é adicionado à cadeia polipeptídica, fazendo com que essa cadeia cresça de sua extremidade amino rumo à sua extremidade carboxila até o momento em que um códon de terminação seja encontrado.

O ribossomo é uma ribozima

O ribossomo é uma das maiores e mais complexas estruturas da célula, sendo composto por dois terços de RNA e um terço de proteína. A determinação, no ano 2000, da estrutura tridimensional completa de suas subunidades grande e pequena foi um dos grandes triunfos da biologia moderna. Essa determinação confirmou fortemente evidências anteriores de que os rRNAs – e não proteínas – eram responsáveis pela estrutura geral do ribossomo e por sua capacidade de orquestrar a síntese proteica.

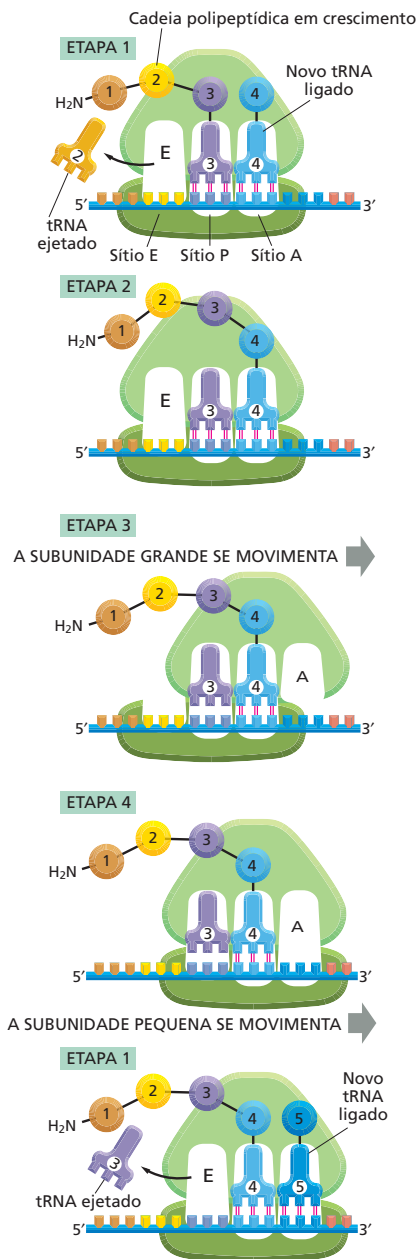



Figura 7-33 A tradução ocorre em um ciclo de quatro etapas. Este ciclo é repetido muitas e muitas vezes durante a síntese de uma cadeia proteica. Na etapa 1, um sRNAt que transporta o próximo aminoácido da cadeia se liga ao sítio A livre no ribossomo pela formação de pares de bases com o códon que está ali exposto. Visto que apenas um dos diversos tipos de moléculas tRNA na célula pode formar pares de bases com cada códon, esse códon determina o aminoácido específico que será adicionado à cadeia polipeptídica em crescimento. Os sítios A e P estão suficientemente próximos para que as duas moléculas de tRNA ali fixadas sejam forçadas a formar pares de bases com códons contiguos, sem que fique qualquer base entre eles. Esse posicionamento dos tRNAs assegura que a fase de leitura correta seja mantida ao longo de toda a síntese da proteína. Na etapa 2, a extremidade carboxila da cadeia polipeptídica é separada do tRNA presente no sítio P e unida por ligações peptídicas ao grupo amino livre do aminoácido que se encontra ligado ao tRNA presente no sítio A. Essa reação é catalisada por um sítio enzimático na subunidade grande. Na etapa 3, um movimento da subunidade grande em relação à subunidade pequena faz com que os dois tRNAs sejam posicionados nos sítios E e P da subunidade grande. Na etapa 4, a subunidade pequena se move exatamente três nucleotídeos sobre a molécula de mRNA, o que a reposiciona novamente sobre sua posição original em relação à subunidade grande. Esse movimento reinicializa o ribossomo que apresenta um sítio A vazio de tal forma que o próximo aminoacil-tRNA pode ligar-se (**Animação 7.8**). Como indicado, o mRNA é traduzido no sentido 5′ – 3′, e a extremidade N-terminal de uma proteína é sintetizada primeiro, cada ciclo adiciona um novo aminoácido à extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica. Para visualizar o ciclo da tradução em detalhes, ver **Animação 7.9**.

Os rRNAs estão dobrados em estruturas tridimensionais altamente precisas e compactas que formam o cerne do ribossomo (Figura 7-34). Em marcante contraste ao posicionamento central do rRNA, as proteínas ribossomais estão geralmente localizadas na superfície, onde preenchem as fendas e frestas do dobramento do RNA. A principal função das proteínas ribossomais parece ser a manutenção da estrutura e da estabilidade do núcleo de RNA, permitindo ainda que aconteçam as alterações na conformação do rRNA que são necessárias para que esse RNA catalise eficientemente a síntese proteica.

Não apenas os três sítios de ligação aos tRNAs (os sítios A, P e E) do ribossomo são formados principalmente por rRNA, mas também o sítio catalítico para a formação da ligação peptídica é formado pelo RNA 23S da subunidade grande. O aminoácido mais próximo está localizado a uma tal distância que impossibilita que esse estabeleça contatos, seja com o aminoacil-tRNA que chega, seja com a cadeia polipeptídica em crescimento. O sítio catalítico nessa peptidil-transferase com base em RNA é semelhante em diversos aspectos àquele encontrado em algumas enzimas proteicas: é uma fenda altamente estruturada que orienta precisamente os dois reagentes, o peptídeo que está sendo estendido e o tRNA carregado, aumentando, assim, as chances de ocorrência de uma reação produtiva.

Moléculas de RNA que possuem atividade catalítica são denominadas **ribozimas**. Na seção final deste capítulo, consideraremos outras ribozimas e discutiremos o que a catálise com base em RNA deve ter significado para a evolução inicial da vida na Terra. No momento, devemos apenas salientar que existe uma boa razão para suspeitar que RNAs, em vez de moléculas proteicas, atuaram como os primeiros catalisadores em células vivas. Se isso é verdade, o ribossomo, com seu núcleo de RNA, pode ser considerado como uma relíquia do período inicial da história da vida, quando as células eram conduzidas quase que exclusivamente por ribozimas.

QUESTÃO 7-5

A seguinte sequência de nucleotídeos de uma fita de DNA foi usada como molde para a síntese de um mRNA que foi então traduzido em proteína: 5′ – TTAACGGCTTTTTTC-3′. Determine o aminoácido C-terminal e o aminoácido N-terminal do polipeptídeo resultante. Assuma que o mRNA é traduzido sem a necessidade de um códon de iniciação.

Os códons do mRNA sinalizam onde a síntese proteica deve iniciar e terminar

Apesar de ser possível forçar os ribossomos a traduzir qualquer RNA em tubos de ensaio (ver Como Sabemos, p. 248-249), nas células, a tradução requer um sinal de início específico. O ponto sobre o qual a síntese proteica tem início no mRNA é essencial, pois ele determina a fase de leitura que será seguida em toda a extensão da mensagem. Um erro de um nucleotídeo em qualquer dos sentidos, nessa etapa, fará com que cada códon subsequente da mensagem seja erroneamente lido, de tal forma que será sintetizada uma proteína não funcional, composta por uma sequência equivocada de aminoácidos (ver Figura 7-27).

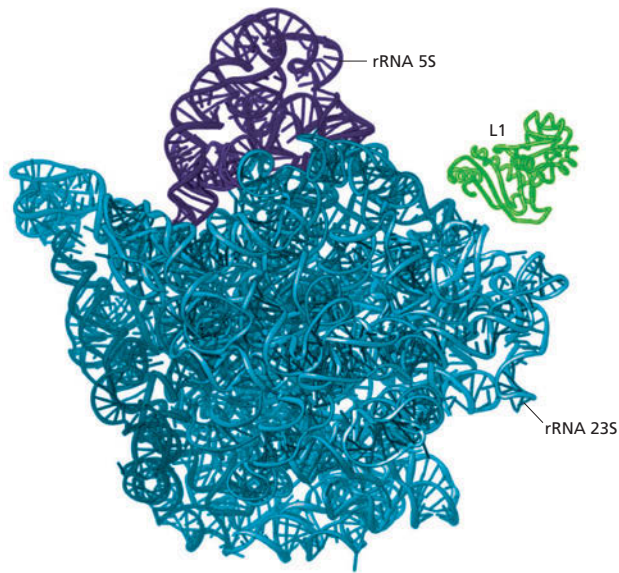



Figura 7-34 Os RNAs ribossomais conferem ao ribossomo sua forma geral. São apresentadas as estruturas detalhadas de dois rRNAs, o rRNA 23S (*azul*) e o rRNA 5S (*púrpura*), que formam o núcleo da subunidade grande dos ribossomos. Uma das subunidades proteicas do ribossomo (L1) está incluída como ponto de referência, visto que essa proteína é responsável por uma protuberância característica na superfície ribossomal. Os componentes ribossomais são geralmente designados por seu "valor S", o qual se refere à taxa de sedimentação em ultracentrifugação. (Adaptada de N. Ban *et al.*, *Science* 289:905-920, 2000. Com permissão de AAAS.)

A etapa de iniciação é também extremamente importante sob outro aspecto: esse é o último momento no qual a célula pode decidir se um mRNA deve ser traduzido; assim, a taxa de iniciação determina a taxa na qual a proteína é sintetizada a partir do RNA.

A tradução de um mRNA tem início com o códon AUG, e um tRNA especial é necessário para a iniciação da tradução. Esse **tRNA iniciador** sempre carrega o aminoácido metionina (ou uma forma modificada de metionina, a formilmetionina, em bactérias) de tal forma que todas as proteínas recém-sintetizadas possuem metionina como seu primeiro aminoácido, na extremidade N-terminal, a extremidade proteica que é primeiramente sintetizada. Essa metionina é em geral removida posteriormente pela ação de uma protease específica. O tRNA iniciador é distinto do tRNAs que normalmente transporta metionina.

Em eucariotos, o tRNAs iniciador que está acoplado à metionina é inicialmente posicionado sobre a subunidade ribossomal pequena junto com proteínas adicionais denominadas **fatores de iniciação de tradução** (Figura 7-35). Dentre todos os tRNAs carregados da célula, apenas o tRNA iniciador carregado é capaz de se associar fortemente ao sítio P de uma subunidade ribossomal pequena. A seguir, essa subunidade ribossomal carregada se liga à extremidade 5′ de uma molécula de mRNA, a qual é em parte reconhecida pela presença de seu quepe típico de mRNAs eucarióticos (ver Figura 7-16). A subunidade ribossomal pequena então se move para a frente (de 5′ para 3′) sobre o mRNA, à procura do primeiro códon AUG. Quando esse AUG é encontrado, diversos fatores de iniciação se dissociam da subunidade ribossomal pequena, dando espaço para a associação da subunidade ribossomal grande e consequente montagem de um ribossomo completo. Visto que o tRNA iniciador está ligado ao sítio P, a síntese proteica está pronta para ter início pela adição do próximo tRNA acoplado a seu aminoácido sobre o sítio A (ver Figura 7-35).

O mecanismo de seleção de um códon de iniciação é diferente em bactérias. Os mRNAs bacterianos não possuem o quepe 5′ para indicar ao ribossomo

Figura 7-35 A fase de iniciação da síntese de proteínas em eucariotos requer fatores de iniciação e um tRNA iniciador especial. Apesar de não estarem aqui ilustradas, uma iniciação de tradução eficiente também requer proteínas adicionais (ilustradas na Figura 7-22) ligadas ao quepe 5′ e à cauda poli-A do mRNA. Dessa maneira, o aparato de tradução se certifica que ambas as extremidades do mRNA estejam intactas antes da iniciação da tradução. Após a iniciação, a proteína é sintetizada pelas reações descritas na Figura 7-33.

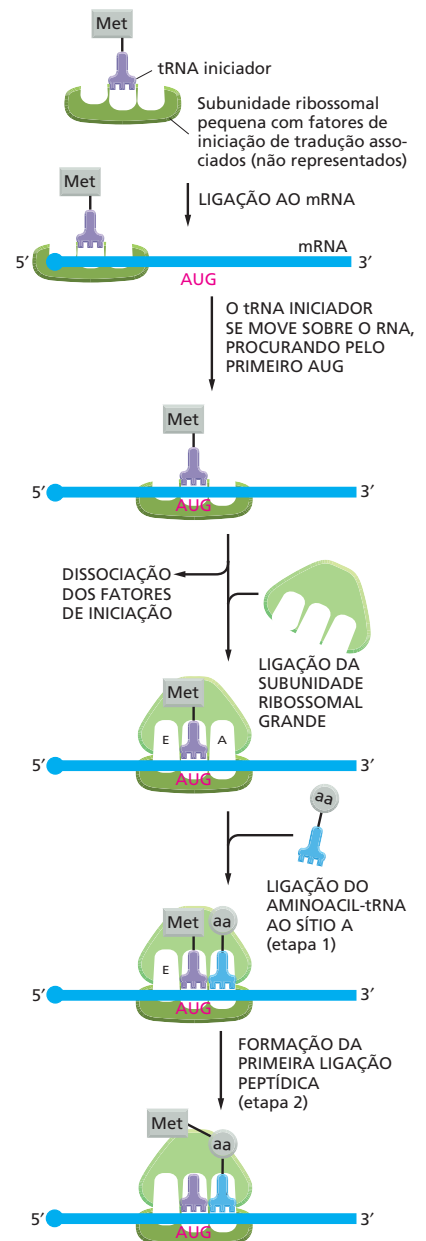
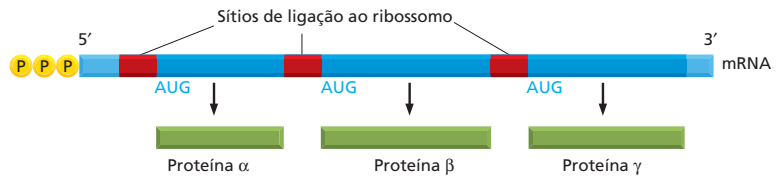
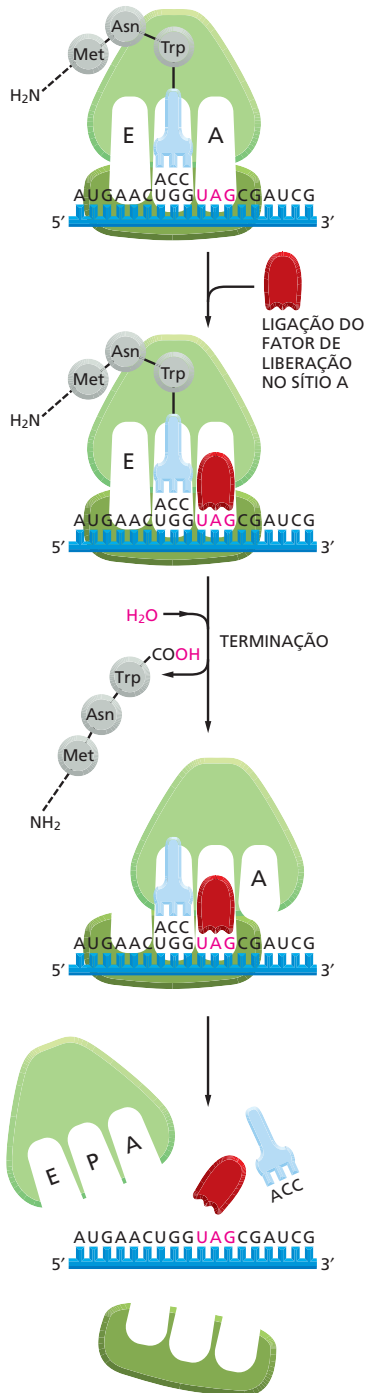



Figura 7-36 Uma única molécula de mRNA procariótico pode codificar várias proteínas diferentes. Em procariotos, genes envolvidos em diferentes passos de um mesmo processo se encontram frequentemente organizados em grupos (óperons) que são transcritos juntos sob a forma de um único mRNA. Diferentemente dos ribossomos eucarióticos, os quais reconhecem um quepe 5′, os ribossomos procarióticos iniciam a transcrição em sítios de ligação ao ribossomo (*vermelho*), os quais podem estar localizados no interior de uma molécula de mRNA. Essa característica permite que procariotos sintetizem várias proteínas distintas a partir de uma única molécula de mRNA.

onde iniciar a busca pelo ponto de início da tradução. Em vez disso, eles contêm sequências específicas de ligação a ribossomos, com comprimento de até seis nucleotídeos que estão localizadas poucos nucleotídeos à montante dos AUGs sobre os quais a tradução deve ter início. Diferentemente de um ribossomo eucariótico, um ribossomo procariótico pode, com facilidade, ligar-se diretamente a um códon de iniciação que esteja localizado no interior de um mRNA, desde que um sítio de ligação ao ribossomo o preceda em vários nucleotídeos. Tais sequências de ligação ao ribossomo são necessárias em bactérias, pois os mRNAs procarióticos são frequentemente *policistrônicos* – ou seja, eles codificam várias proteínas diferentes, todas elas sendo traduzidas a partir da mesma molécula de mRNA (**Figura 7-36**). Em contraste, um mRNA eucariótico geralmente transporta informação referente a uma única proteína.

O fim de uma mensagem codificadora de proteína, tanto em procariotos quanto em eucariotos, é sinalizado pela presença de um dos diversos códons chamados de *códons de terminação* (ver Figura 7-26). Esses códons especiais (UAA, UAG e UGA) não são reconhecidos por um tRNA e não determinam qualquer aminoácido, sinalizando para o ribossomo o término da tradução. Proteínas conhecidas como *fatores de liberação* se ligam a qualquer códon de terminação que chegue a um sítio A do ribossomo, e essa ligação altera a atividade peptidil-transferase no ribossomo, fazendo com que ela catalise a adição de uma molécula de água, em vez de um aminoácido ao peptidil-tRNA (**Figura 7-37**). Essa reação libera a extremidade carboxila da cadeia polipeptídica de sua conexão à molécula de tRNA, e, considerando-se que esse era o único elo de ligação que mantinha o polipeptídeo em crescimento associado ao ribossomo, a cadeia proteica completa é imediatamente liberada no citosol. O ribossomo libera o mRNA e se dissocia em suas duas subunidades, as quais podem associar-se novamente sobre outra molécula de mRNA para dar início a um novo ciclo de síntese proteica.

Vimos, no Capítulo 4, que muitas proteínas podem dobrar-se espontaneamente adquirindo uma estrutura tridimensional definida e que algumas realizam esse dobramento conforme estão sendo sintetizadas no ribossomo. No entanto, a maior parte das proteínas requer o auxílio de *chaperonas moleculares* para executar o dobramento adequado na célula. As chaperonas mais bem estudadas usam ciclos sucessivos de hidrólise de ATP para ligar e liberar continuamente proteínas recém-sintetizadas até que essas estejam adequadamente dobradas. Essa manipulação direciona as proteínas rumo vias de dobramento produtivo, evitando que elas formem agregados ou que adquiram conformações inadequadamente dobradas. As proteínas recém-sintetizadas são frequentemente interceptadas por suas chaperonas conforme emergem do ribossomo.

Figura 7-37 Na fase final da síntese proteica, a ligação de um fator de liberação no sítio A sobre um códon de terminação finaliza a tradução. O polipeptídeo completo é liberado, e o ribossomo se dissocia liberando suas duas subunidades.

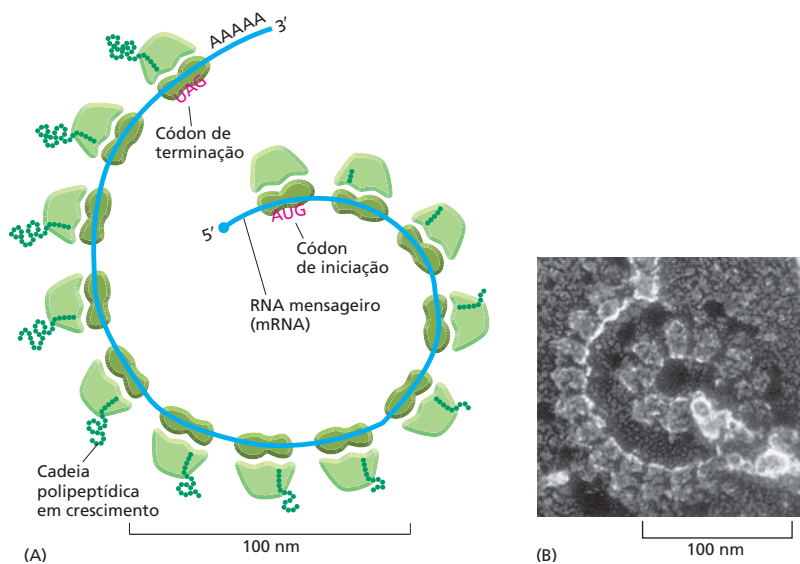



Figura 7-38 As proteínas são traduzidas por polirribossomos. (A) Desenho esquemático mostrando como uma série de ribossomos pode traduzir simultaneamente a mesma molécula de mRNA (**Animação 7.10**). (B) Microfotografia eletrônica de um polirribossomo de uma célula eucariótica. (B, cortesia de John Heuser.)

As proteínas são produzidas em polirribossomos

A síntese da maior parte das moléculas proteicas leva entre 20 segundos e alguns minutos. No entanto, mesmo durante esse curto intervalo de tempo, geralmente ocorrem múltiplas iniciações sobre cada molécula de mRNA que está sendo traduzida. Se o mRNA está sendo traduzido eficientemente, um novo ribossomo é montado sobre a extremidade 5′ de uma molécula de mRNA quase que imediatamente após o ribossomo precedente ter traduzido uma sequência nucleotídica longa o suficiente para não mais o atrapalhar. Consequentemente, as moléculas de mRNA que estão sendo traduzidas são, geralmente, encontradas sob a forma de *polirribossomos* (também denominados *polissomos),* grandes agregados citoplasmáticos compostos por vários ribossomos espaçados por segmentos tão curtos quanto 80 nucleotídeos, sobre uma única molécula de mRNA (**Figura 7-38**). Essas iniciações múltiplas significam que muito mais moléculas de proteína podem ser feitas em um dado período do que seria possível se cada molécula tivesse de ser concluída antes que a próxima fosse iniciada.

Tanto bactérias quanto eucariotos utilizam os polissomos, mas as bactérias podem tornar a síntese proteica ainda mais rápida. Visto que o mRNA bacteriano não precisa ser processado e também se encontra fisicamente acessível aos ribossomos mesmo durante a síntese, os ribossomos se ligarão à extremidade livre de uma molécula de mRNA bacteriano e começarão a traduzi-la antes mesmo do término da transcrição do RNA. Esses ribossomos seguem o encalço da RNA-polimerase, conforme essa se move sobre o DNA.

Os inibidores da síntese proteica de procariotos são utilizados como antibióticos

A capacidade de traduzir eficientemente mRNA em proteínas é uma característica fundamental de toda a vida na Terra. Apesar de os ribossomos e outras moléculas que executam essa fantástica tarefa serem muito similares quando comparados a diferentes organismos, existem algumas diferenças sutis, como vimos, no mecanismo utilizado para a síntese de proteínas por bactérias e eucariotos. Apesar de uma peculiaridade evolutiva, essas diferenças formam a base de um dos mais importantes avanços da medicina moderna.

Vários dos mais efetivos antibióticos são compostos que atuam pela inibição da síntese proteica bacteriana, mas não afetam a síntese proteica eucariótica. Alguns desses fármacos exploram pequenas diferenças estruturais e funcionais existentes entre os ribossomos bacterianos e eucarióticos, de tal forma que in-

TABELA 7-3 Antibióticos que inibem a síntese proteica ou de RNA

Antibiótico	Efeito específico
Tetraciclina	Bloqueia a ligação da aminoacil-tRNA ao sítio A do ribossomo (etapa 1 na Figura 7-33)
Streptomicina	Evita a transição do complexo de iniciação para um ribossomo capaz de extensão de cadeia (ver Figura 7-35); também pode causar erros de decodificação
Cloranfenicol	Bloqueia a reação de peptidil-transferase nos ribossomos (etapa 2 na Figura 7-33)
Cicloexamida	Bloqueia a reação de translocação nos ribossomos (etapa 3 na Figura 7-33)
Rifamicina	Bloqueia a iniciação das cadeias de RNA por meio de ligação à RNA-polimerase

terfere preferencialmente na síntese proteica bacteriana. Assim, esses compostos podem ser administrados em doses relativamente altas sem que apresentem toxicidade em seres humanos. Visto que diferentes antibióticos se ligam a diferentes regiões sobre o ribossomo bacteriano, essas medicações frequentemente inibem passos diferentes do processo de síntese proteica. Alguns dentre os mais comuns antibióticos dessa classe estão listados na **Tabela 7-3**.

Diversos antibióticos comumente utilizados foram inicialmente isolados de fungos. Fungos e bactérias frequentemente ocupam os mesmos nichos ecológicos; para ter uma vantagem competitiva, os fungos desenvolveram, ao longo do tempo, toxinas potentes que matam bactérias, mas são inócuas a eles próprios. Visto que fungos e seres humanos são eucariotos e consequentemente são mais intimamente relacionados entre si do que qualquer um deles o é em relação às bactérias (ver Figura 1-29), podemos pegar emprestado esses compostos para combater nossos próprios inimigos bacterianos.

Uma degradação proteica cuidadosamente controlada ajuda a regular a quantidade de cada proteína na célula

Após uma proteína ser liberada do ribossomo, ela fica sujeita a uma série de controles efetuados pela célula. O número de cópias de uma proteína em uma célula depende, assim como ocorre em uma população humana, não apenas de quão rápido novos indivíduos podem ser gerados, mas também de quanto tempo eles sobreviverão. Assim, a degradação de proteínas em seus aminoácidos constituintes, mediada pela célula, é uma forma de regular a quantidade de uma dada proteína presente em um momento determinado. As proteínas diferem enormemente em relação à sua duração, ou tempo de vida. Proteínas estruturais que fazem parte de tecidos relativamente permanentes, como ossos ou músculos, podem durar meses ou mesmo anos, ao passo que outras proteínas, como enzimas metabólicas e proteínas que regulam o ciclo de crescimento, a mitose e a divisão celular (discutidos no Capítulo 18), duram apenas alguns dias, horas ou mesmo segundos. Como a célula controla essa duração?

As células possuem vias especializadas para a quebra, ou digestão, enzimática de proteínas em seus aminoácidos constituintes (um processo denominado *proteólise).* As enzimas que degradam proteínas, inicialmente em peptídeos pequenos e finalmente nos aminoácidos individuais, são coletivamente denominadas **proteases**. As proteases atuam pela clivagem (hidrólise) das ligações peptídicas entre os aminoácidos (ver Painel 2-5, p. 72-73). Uma das funções das vias proteolíticas é a rápida degradação das proteínas que devem ter curta duração. Outra é o reconhecimento e a eliminação de proteínas que estejam danificadas ou erroneamente dobradas. A eliminação de proteínas com conformações errôneas é essencial para um organismo, como pode ser observado pelo fato de doenças neurodegenerativas, como as doenças de

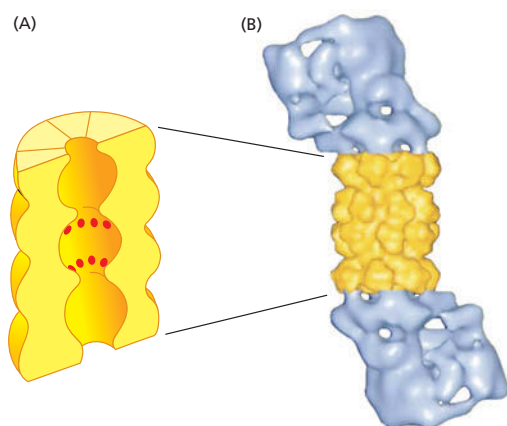



Figura 7-39 O proteassomo degrada proteínas de curta duração ou proteínas dobradas erroneamente. (A) Uma visão em corte da estrutura do cilindro central do proteassomo, determinada a partir de cristalografia por raios X, com os sítios ativos das proteases indicados por *pontos vermelhos*. (B) A estrutura completa do proteassomo, na qual o cilindro central (*amarelo*) é acrescido de um quepe (*púrpura*) em cada extremidade. (B, de W. Baumeister *et al.*, *Cell* 92:367-380, 1998. Com permissão de Elsevier.)

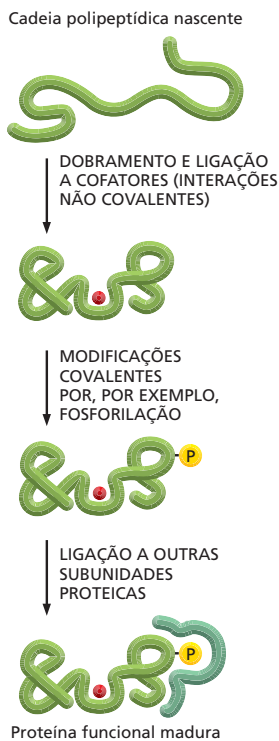
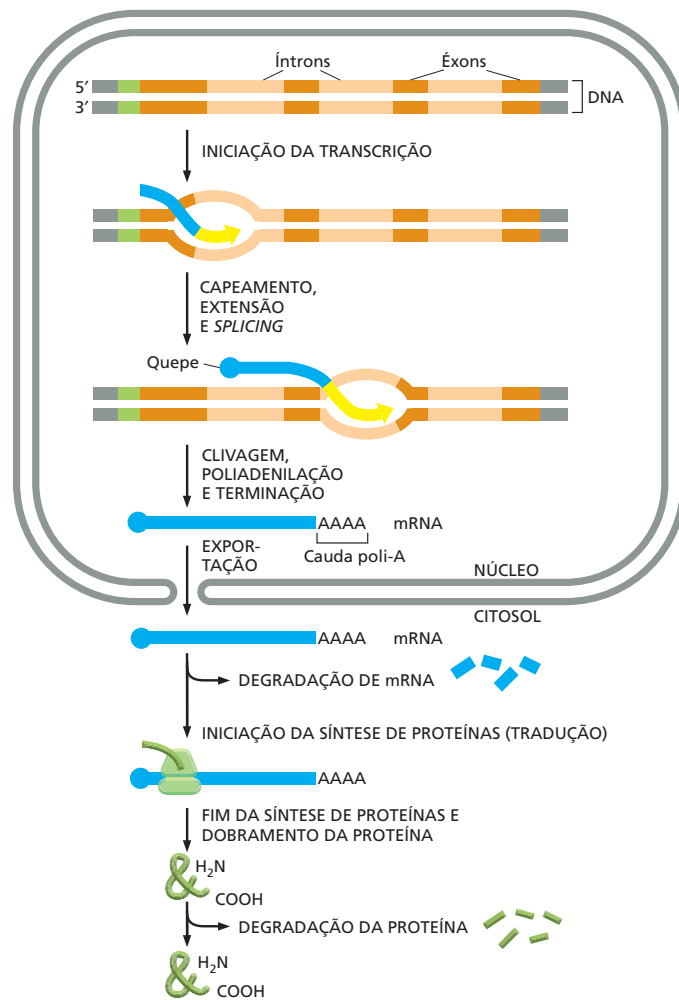
Huntington, Alzheimer e Creutzfeldt-Jacob serem causadas pela agregação de proteínas dobradas erroneamente. Esses agregados proteicos podem provocar sérios danos a células e tecidos e mesmo levar à morte celular. Apesar de a maioria das proteínas danificadas ser digerida no citosol, importantes vias de degradação proteica também operam em outros compartimentos celulares eucarióticos, como os lisossomos (discutidos no Capítulo 15). Em células eucarióticas, a maior parte das proteínas é degradada por estruturas denominadas **proteassomos**. Um proteassomo contém um cilindro central formado por proteases cujos sítios ativos estão dirigidos para a face interna de uma câmara. Cada extremidade desse cilindro é tampada por um grande complexo proteico formado por pelo menos 10 diferentes tipos de subunidades proteicas (**Figura 7-39**). Essas tampas proteicas se ligam às proteínas destinadas à digestão e então – usando a hidrólise de ATP como combustível para sua atividade – as inserem no interior da câmara do cilindro. Nesse compartimento, as proteases cortam as proteínas em pequenos peptídeos, os quais são a seguir liberados pela extremidade do proteassomo. Manter as proteases dentro dessa câmara de destruição parece fazer sentido, pois evita que elas fiquem livres, correndo desenfreadamente pela célula.

Como o proteassomo seleciona quais proteínas da célula devem ser inseridas no cilindro para sofrer degradação? Os proteassomos atuam principalmente sobre proteínas que foram marcadas para destruição pela ligação covalente a uma pequena proteína denominada *ubiquitina.* Enzimas especializadas marcam as proteínas selecionadas com uma ou mais moléculas de ubiquitina; a seguir, essas proteínas ubiquitinadas são reconhecidas e inseridas no proteassomo pelas proteínas da tampa.

Proteínas que devem ter vida curta frequentemente ostentam uma sequência curta de aminoácidos que as identificam como devendo ser ubiquitinadas e, consequentemente, degradadas pelo proteassomo. Proteínas desnaturadas ou erroneamente dobradas, bem como proteínas que contêm aminoácidos oxidados ou alterados de qualquer outro modo, são também reconhecidas e degradadas por esse sistema proteolítico dependente de ubiquitina. As enzimas que adicionam ubiquitina a essas proteínas reconhecem sinais que se tornam expostos como resultado do dobramento inadequado ou devido a dano químico – por exemplo, sequências de aminoácidos ou motivos conformacionais que estão normalmente escondidos e inacessíveis.

Existem várias etapas entre DNA e proteína

Vimos até o momento, neste capítulo, que diferentes tipos de reações químicas são necessários para a produção de uma proteína a partir da informação contida em um gene (**Figura 7-40**). A concentração final de uma proteína em uma célula, consequentemente, depende da eficiência na qual cada uma dessas diversas etapas é realizada. Além disso, diversas proteínas – depois de serem liberadas

Figura 7-40 A produção de uma proteína em uma célula eucariótica requer diversas etapas. A concentração final de cada proteína depende da eficiência de cada etapa indicada. Mesmo após uma proteína ter sido traduzida, sua concentração pode ser regulada por degradação, e sua atividade pode ser regulada por meio de ligação a pequenas moléculas, ou via outras alterações pós-traducionais (ver Figura 7-41).

no ribossomo – necessitam de outras alterações para que possam ser úteis às células. Por exemplo, modificações covalentes (como a fosforilação), a ligação a pequenas moléculas cofatores ou a associação a outras subunidades proteicas são frequentemente necessárias para a ativação de proteínas recém-sintetizadas (**Figura 7-41**).

Veremos, no próximo capítulo, que as células possuem a capacidade de alterar os níveis da maior parte de suas proteínas de acordo com suas necessidades. Em princípio, todas as etapas da Figura 7-40 podem ser reguladas pela célula. No entanto, a iniciação da transcrição é o ponto mais comum usado pelas células para regular a expressão de cada um de seus genes.

A transcrição e a tradução são processos universais que se localizam na base da vida. No entanto, quando os cientistas começaram a considerar como o fluxo de informações do DNA para proteína deve ter-se originado, surgiram algumas conclusões inesperadas.

Cadeia polipeptídica nascente

DOBRAMENTO E LIGAÇÃO A COFATORES (INTERAÇÕES NÃO COVALENTES)

MODIFICAÇÕES COVALENTES POR, POR EXEMPLO, FOSFORILAÇÃO

P

LIGAÇÃO A OUTRAS SUBUNIDADES PROTEICAS

P

Proteína funcional madura

Figura 7-41 Diversas proteínas necessitam de modificações adicionais para tornarem-se plenamente funcionais. Para ser útil à célula, um polipeptídeo completo deve estar adequadamente dobrado sob sua conformação tridimensional, ligado aos cofatores necessários e agrupado a suas proteínas acessórias. A formação de ligações covalentes conduz essas alterações. Diversas proteínas também necessitam de modificações covalentes para tornarem-se ativas. Apesar de a fosforilação e a glicosilação serem as alterações mais comuns, mais de 100 diferentes tipos de modificações covalentes são conhecidas para as proteínas.

RNA E A ORIGEM DA VIDA

Para compreender plenamente os processos que ocorrem nas células atuais, devemos considerar como as células evoluíram. No entanto, um processo essencial – a expressão gênica – nos confronta a um intrigante desafio: se são necessários ácidos nucleicos para direcionar a síntese de proteínas e se proteínas são necessárias para a síntese de ácidos nucleicos, como esse sistema de componentes interdependentes pode ter-se originado? Uma das hipóteses é a que considera a existência de um *mundo de RNA* na Terra antes do surgimento das células modernas (**Figura 7-42**). De acordo com essa hipótese, o RNA – que hoje serve de intermediário entre os genes e as proteínas – tanto estocava informação genética quanto catalisava reações químicas nas células primitivas. Apenas tardiamente, em termos evolutivos, o DNA suplantou o RNA como material genético, e as proteínas se tornaram os principais componentes catalisadores e estruturais das células. Se essa ideia está correta, então, a transição do mundo de RNA nunca foi completa; como vimos, neste capítulo, o RNA ainda catalisa várias reações fundamentais nas células atuais. Esses RNA catalisadores, inclusive o ribossomo e a maquinaria de *splicing* de RNA, podem então ser considerados como fósseis moleculares de um mundo anterior.

A vida requer autocatálise

A origem da vida necessitou de moléculas que possuíssem, pelo menos em um determinado nível, uma propriedade essencial: a capacidade de catalisar reações que levassem – direta ou indiretamente – à produção de mais moléculas idênticas a elas. Catalisadores com essa propriedade especial de autopromoção, a partir do surgimento ao acaso, poderiam se reproduzir e, desse modo, gerar matéria-prima para a produção de outras substâncias. Dessa maneira, podemos imaginar o desenvolvimento gradual de um sistema químico de crescente complexidade composto de monômeros e polímeros orgânicos que funcionariam em conjunto para a geração de mais moléculas semelhantes, abastecido por um suplemento de matérias-primas simples presentes no ambiente. Um sistema *autocatalítico* dessa natureza deveria ter muitas das propriedades que consideramos como características de matéria viva: o sistema deve conter uma seleção não aleatória de moléculas interativas; ele deve tender à própria reprodução; deve competir com outros sistemas dependentes das mesmas matérias-primas, e, se deprivado de suas matérias-primas ou mantido a uma temperatura que provoque um distúrbio no balanço das taxas de reação, deve decair rumo a um equilíbrio químico e "morrer".

Que moléculas podem ter apresentado tais propriedades autocatalíticas? Nas células vivas atuais, os catalisadores mais versáteis são as proteínas – capazes de adotar diferentes formas tridimensionais que atuam como sítios quimicamente reativos. No entanto, não é conhecido qualquer meio pelo qual uma proteína possa reproduzir a si própria diretamente. Ácidos nucleicos, no entanto, podem desempenhar todas essas tarefas.

O RNA pode tanto estocar informação como catalisar reações químicas

O sistema de complementaridade de pares de bases permite que um ácido nucleico atue como molde para a formação de outro. Assim, uma fita simples de RNA ou DNA pode determinar a sequência de um polinucleotídeo complementar,

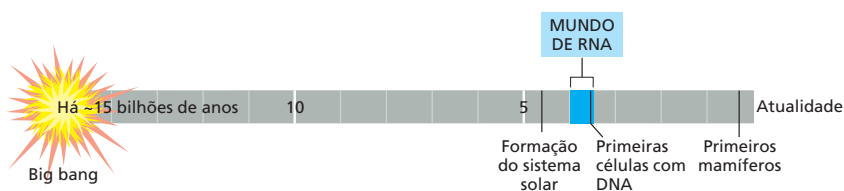
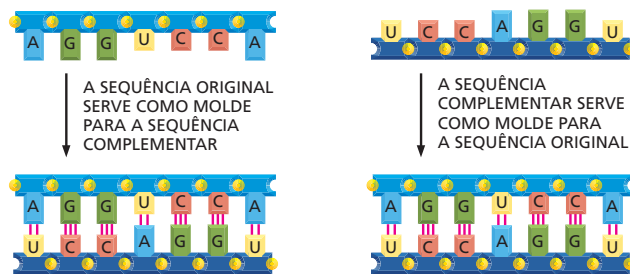



Figura 7-42 Um mundo de RNA pode ter existido antes do surgimento das células modernas.

Figura 7-43 Uma molécula de RNA pode, em princípio, direcionar a formação de uma cópia exatamente igual a ela. Na primeira etapa, a molécula original de RNA atua como molde para formar uma molécula de RNA de sequência complementar. Na segunda etapa, essa molécula de RNA complementar atua, por sua vez, como molde, dando origem a moléculas de RNA com a sequência original. Visto que cada molécula-molde pode produzir diversas cópias da fita complementar, essas reações podem resultar em "multiplicação" da sequência original.

o qual, por sua vez, pode determinar a sequência da molécula original, permitindo que o ácido nucleico original seja replicado (Figura 7-43). Esses mecanismos de molde por complementaridade formam a base da replicação do DNA e da transcrição nas células atuais.

No entanto, a síntese eficiente de polinucleotídeos por meio de tais mecanismos de molde por complementaridade também necessita de catalisadores que promovam a reação de polimerização: sem catalisadores, a formação do polímero é lenta, sujeita a erros e ineficiente. Atualmente, a polimerização de nucleotídeos é rapidamente catalisada por enzimas proteicas – como a DNA e a RNA-polimerases. No entanto, como poderiam ter sido catalisadas essas reações antes da existência de proteínas que contivessem a especificidade catalítica adequada? O começo de uma resposta para essa questão foi obtido em 1982, quando foi descoberto que moléculas de RNA *per se* podem atuar como catalisadoras. Vimos, por exemplo, que uma molécula de RNA catalisa a reação peptidil-transferase que ocorre no ribossomo. Acredita-se que o potencial sem igual das moléculas de RNA, que as torna capazes de atuar tanto como carreadoras de informação quanto como catalisadoras, tenha permitido que elas desempenhassem um papel central na origem da vida.

Nas células atuais, o RNA é sintetizado sob a forma de uma molécula de fita simples, e vimos que pareamentos por complementaridade de bases podem ocorrer entre nucleotídeos sobre a própria fita (ver Figura 7-5). Esses pareamentos de base, junto a pontes de hidrogênio "não convencionais", podem fazer com que a molécula de RNA se dobre adquirindo uma estrutura específica, a qual é determinada por sua sequência nucleotídica. Tais associações produzem padrões tridimensionais complexos de dobramento, onde a molécula como um todo adota uma forma especial.

Como vimos no Capítulo 4, enzimas proteicas são capazes de catalisar reações bioquímicas, pois possuem uma superfície com contornos característicos e propriedades químicas sobre as quais um dado substrato pode reagir. Da mesma forma, as moléculas de RNA, com suas formas caracteristicamente dobradas, podem atuar como enzimas (Figura 7-44), embora o fato de serem construídas a partir de apenas quatro diferentes subunidades limite sua eficiência catalítica e o espectro de reações químicas que podem por elas ser catalisadas, quando comparado às proteínas. Apesar dessas limitações, ribozimas podem catalisar um espectro bastante variado de reações químicas. A maioria das ribozimas já estudadas foi sintetizada em laboratórios (Tabela 7-4), e relativamente poucos desses RNAs catalíticos existem em células atuais. No entanto, os processos nos quais RNAs catalíticos ainda desempenham um papel importante incluem algumas das etapas mais fundamentais da expressão da informação genética – espe-

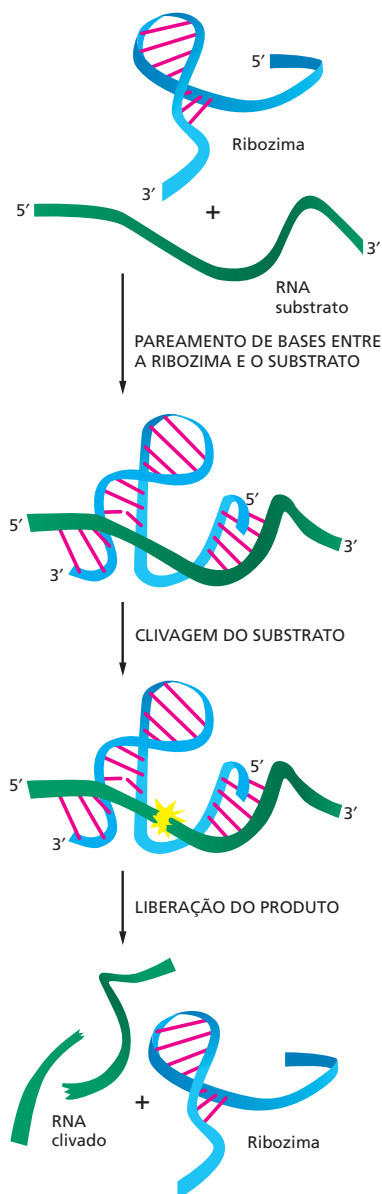



Figura 7-44 Uma ribozima é uma molécula de RNA que possui atividade catalítica. A molécula de RNA simples ilustrada catalisa a clivagem de uma segunda molécula de RNA em um sítio específico. Essa ribozima é encontrada inserida em grandes genomas de RNA – denominados viroides – que infectam plantas. A clivagem, que ocorre na natureza em uma posição distante, sobre a própria molécula de RNA que contém a ribozima, é uma das etapas da replicação do genoma RNA. Essa reação também necessita de um íon magnésio (não representado), que é posicionado próximo ao sítio de clivagem, sobre o substrato. (Adaptado de T.R. Cech e O.C. Uhlenbeck, *Nature* 372:39-40, 1994. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

TABELA 7-4 Reações bioquímicas que podem ser catalisadas por ribozimas

Atividade	Ribozimas
Clivagem de RNA, ligação de RNA	RNAs de autosplicing
Clivagem de DNA	RNAs de autosplicing
Formação da ligação peptídica na síntese de proteínas	RNA ribossomal
Ligação de DNA	RNA selecionado *in vitro*
Splicing de RNA	RNAs de autosplicing, RNAs do spliceossomo (?),
Polimerização de RNA	RNA selecionado *in vitro*
Fosforilação de RNA	RNA selecionado *in vitro*
Aminoacilação de RNA	RNA selecionado *in vitro*
Alquilação de RNA	RNA selecionado *in vitro*
Rotação de ligação C-C (isomerização)	RNA selecionado *in vitro*

cialmente aquelas etapas onde as próprias moléculas de RNA sofrem *splicing* ou são traduzidas em proteínas.

Assim, o RNA possui todas as características necessárias a uma molécula que possa catalisar sua própria síntese (**Figura 7-45**). Sistemas de autorreplicação de moléculas de RNA não foram encontrados na natureza, mesmo assim cientistas estão confiantes de que eles possam ser construídos em laboratório. Apesar de essa demonstração não provar que moléculas de RNA autorreplicadoras foram essenciais para a origem da vida na Terra, ela certamente demonstraria que um cenário assim é possível.

O RNA provavelmente antecedeu o DNA na evolução

As primeiras células na Terra presumivelmente eram bem menos complexas e menos eficientes na reprodução de si mesmas se comparadas mesmo à mais simples das células atuais. Elas devem ter sido compostas por pouco mais do que uma simples membrana delimitando um conjunto de moléculas de autorreplicação e alguns outros poucos componentes necessários para fornecer materiais e energia para sua replicação. Se as especulações evolutivas sobre o RNA salientadas estão corretas, essas células primordiais devem também ter apresentado diferenças fundamentais em relação às células que conhecemos atualmente por estocarem sua informação hereditária sob a forma de RNA, e não DNA.

Evidências que indicam o surgimento do RNA antes do DNA na evolução podem ser encontradas nas diferenças químicas existentes entre eles. A ribose (ver Figura 7-3A), assim como a glicose e outros carboidratos simples, é facilmente formada a partir de formaldeído (HCHO), o qual é um dos principais produtos formados em experimentos que simulam as condições da Terra primitiva. O açúcar desoxirribose é mais difícil de ser obtido e, nas células atuais, é produzido a partir da ribose por uma reação catalisada por uma enzima proteica, sugerindo que a ribose antecedeu a desoxirribose nas células. Presumivelmente, o DNA surgiu tardiamente em cena e então se mostrou mais adaptado do que o RNA como

Figura 7-45 Pode uma molécula de RNA catalisar sua própria síntese? Esse processo hipotético necessitaria da catálise de ambas as etapas ilustradas na Figura 7-43. Os raios *vermelhos* representam o sítio ativo dessa enzima RNA.

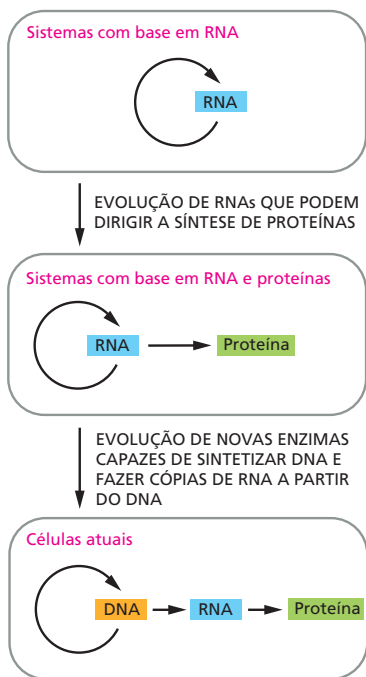



Figura 7-46 O RNA pode ter antecedido o DNA e as proteínas na evolução. De acordo com essa ideia, as moléculas de RNA proviam funções genéticas, estruturais e catalíticas para as primeiras células. Atualmente, o DNA é o repositório de informação genética, e as proteínas desempenham a quase totalidade das funções catalíticas nas células. O RNA funciona, atualmente, de forma principal como um intermediário na síntese de proteínas, embora permaneça atuando como catalisador em poucas reações essenciais.

repositório permanente de informação genética. Em particular, a desoxirribose com sua estrutura açúcar-fosfato torna as cadeias de DNA muito mais estáveis quimicamente do que as cadeias de RNA, de modo que moléculas mais longas de DNA podem ser mantidas sem que ocorra quebra.

As outras diferenças entre RNA e DNA – a estrutura em dupla-hélice do DNA e o uso de timina em vez de uracila – aumentam ainda mais a estabilidade do DNA ao fazer essa molécula mais fácil de reparar. Vimos, no Capítulo 6, que um nucleotídeo lesado sobre uma fita do DNA dupla-hélice pode ser reparado usando-se a outra fita como molde. Além disso, a desaminação, uma das alterações químicas deletérias mais comuns que ocorrem em polinucleotídeos, é mais fácil de ser detectada e reparada no DNA do que no RNA (ver Figura 6-23). Isso acontece porque o produto da desaminação de citosina é, por uma questão de sorte, a uracila, a qual ocorre normalmente no RNA, de tal forma que seria impossível para enzimas de reparo detectarem tal alteração na molécula de RNA. No entanto, no DNA, que possui timina em vez de uracila, qualquer uracila produzida pela degradação acidental de citosina é facilmente detectada e reparada.

Em conjunto, as evidências que estivemos discutindo sustentam a ideia de que o RNA, possuindo tanto propriedades genéticas quanto catalíticas, antecedeu o DNA na evolução. Acredita-se que conforme células mais semelhantes às células atuais apareceram, muitas das funções originalmente desempenhadas pelo RNA foram sendo direcionadas para moléculas mais especificamente adaptadas para as tarefas em questão. Em um determinado ponto, o DNA se sobrepôs na função genética principal, e as proteínas se tornaram as principais catalisadoras, e o RNA permaneceu predominantemente como um intermediário, conectando-os (Figura 7-46). Com o advento do DNA, as células foram capazes de se tornar mais complexas, pois eram capazes de transportar e transmitir mais informação genética do que poderia anteriormente ser mantido de forma estável em uma molécula de RNA. Tendo em vista a maior complexidade química das proteínas e a maior diversidade das reações químicas que elas podiam catalisar, a troca (apesar de incompleta) do RNA pelas proteínas também forneceu uma fonte muito mais rica de componentes estruturais e enzimas. Isso permitiu que as células evoluíssem sob a ampla diversidade estrutural e funcional que vemos nos seres vivos da atualidade.

QUESTÃO 7-6

Discuta a seguinte afirmação: "Ao longo da evolução da vida na Terra, o RNA foi rebaixado de sua gloriosa posição de primeiro catalisador de autorreplicação. Sua função atual é de mero mensageiro no fluxo de informações entre o DNA e as proteínas".

CONCEITOS ESSENCIAIS

- **O fluxo de informação genética em todas as células vivas é DNA → RNA → proteína. A conversão das instruções genéticas do DNA para RNA e proteína é denominada expressão gênica.**
- **Para expressar a informação genética transportada no DNA, a sequência nucleotídica de um gene é inicialmente transcrita em RNA. A transcrição é catalisada por uma enzima RNA-polimerase. Sequências nucleotídicas na molécula de DNA indicam para a RNA-polimerase onde iniciar e terminar a transcrição.**
- **O RNA difere do DNA em diversos aspectos. Ele contém o açúcar ribose, em vez de desoxirribose, e a base uracila (U), em vez de timina (T). Os RNAs celulares são sintetizados sob a forma de moléculas de fita simples, as quais frequentemente se dobram adquirindo estruturas tridimensionais bem determinadas.**
- **As células produzem vários tipos funcionalmente diferentes de RNA, como o RNA mensageiro (mRNA), que transporta as instruções de como**

fazer proteínas; o RNA ribossomal (rRNA), que é um dos componentes dos ribossomos, e o RNA transportador (tRNA), que atua como molécula adaptadora na síntese de proteínas.

- A transcrição é iniciada em regiões do DNA denominadas promotores. Para a iniciação da transcrição, as polimerases eucarióticas necessitam da montagem de um complexo de fatores gerais de transcrição sobre o promotor, ao passo que a RNA-polimerase bacteriana necessita apenas de uma subunidade adicional, denominada fator sigma.
- No DNA eucariótico, a maioria dos genes é composta por uma série de pequenas regiões codificadoras menores (éxons) interespaçadas por regiões não codificadoras (íntrons). Quando um gene eucarioto é transcrito do DNA para RNA, tanto os éxons quanto os íntrons são copiados.
- Os íntrons são removidos dos transcritos de RNA no núcleo pelo processo de *splicing* do RNA. Em uma reação catalisada por pequenos complexos ribonucleoproteicos conhecidos como snRNPs, os íntrons são excisados do transcrito primário, e os éxons são unidos uns aos outros.
- Os mRNAs eucarióticos passam por uma série de etapas adicionais de processamento antes de deixarem o núcleo, como o capeamento do RNA e a poliadenilação. Essas reações, juntamente com o *splicing,* ocorrem conforme o RNA está sendo transcrito. A seguir, o mRNA maduro é transportado para o citoplasma.
- A tradução da sequência de nucleotídeos do mRNA em proteína ocorre no citoplasma em grandes agregados ribonucleoproteicos denominados ribossomos. Conforme o mRNA desliza pelo ribossomo, sua mensagem é traduzida em proteína.
- A sequência de nucleotídeos do mRNA é lida em grupos de três nucleotídeos (códons), cada códon correspondendo a um aminoácido.
- A correspondência entre os aminoácidos e os códons é determinada pelo código genético. As possíveis combinações de 4 diferentes nucleotídeos no RNA originam 64 diferentes códons no código genético. A maioria dos aminoácidos é determinada por mais de um códon.
- Os tRNAs atuam como molécula adaptadora na síntese proteica. Enzimas denominadas aminoacil-tRNA-sintetases acoplam os aminoácidos aos tRNAs adequados. Cada tRNA contém uma sequência de três nucleotídeos, o anticódon, que se associa ao códon sobre o mRNA pelo pareamento de bases complementares entre o códon e o anticódon.
- A síntese de proteínas tem início quando um ribossomo se organiza sobre um códon de iniciação (AUG) no mRNA – um processo que é regulado por proteínas denominadas fatores de iniciação da tradução. A cadeia proteica completa é liberada do ribossomo quando um códon de terminação (UAA, UAG ou UGA) é alcançado.
- A ligação sequencial de aminoácidos originando uma cadeia polipeptídica é catalisada por uma molécula de rRNA na subunidade grande ribossomal. Assim, o ribossomo é um exemplo de ribozima, uma molécula de RNA capaz de catalisar uma reação química.
- A degradação de proteínas nas células é cuidadosamente controlada. Algumas proteínas são degradadas no citosol por grandes complexos proteicos denominados proteassomos.
- Considerando nosso conhecimento dos organismos atuais e das moléculas que eles contêm, parece razoável afirmar que os sistemas vivos se originaram a partir da evolução de moléculas RNA capazes de catalisar sua própria replicação.
- Foi proposto que, conforme as células evoluíram, a dupla-hélice de DNA substituiu o RNA como uma molécula mais estável para o armazenamento de informação genética, e as proteínas substituíram os RNAs

como principais componentes catalíticos e estruturais. No entanto, reações importantes, como a formação das ligações peptídicas, são ainda catalizadas por RNA; o que, podemos pensar, nos permite vislumbrar uma parcela do antigo mundo com base em RNA.

TERMOS-CHAVE

Splicing alternativo	Fase de leitura
Aminoacil-tRNA sintetase	RNA ribossomal (rRNA)
Anticódon	Ribossomo
Códon	Ribozima
Éxon	RNA
Expressão gênica	RNA-polimerase
Código genético	Processamento de RNA
Fatores gerais de transcrição	Splicing de RNA
tRNA iniciador	Pequenos RNAs nucleares (snRNAs)
íntron	Spliceossomo
RNA mensageiro (mRNA)	Transcrição
Promotor	RNA transportadores (tRNA)
Protease	Tradução
Proteossomo	Fator iniciador da tradução

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 7-7

Quais das seguintes afirmações estão corretas? Justifique suas respostas.

A. Um determinado ribossomo pode fazer apenas um tipo de proteína.

B. Todos os mRNAs se dobram, adquirindo estruturas tridimensionais particulares, as quais são necessárias para sua tradução.

C. As subunidades grande e pequena de um dado ribossomo permanecem sempre unidas entre elas e nunca substituem a subunidade acompanhante.

D. Os ribossomos são organelas citoplasmáticas encapsuladas por uma membrana única.

E. Visto que as duas fitas do DNA são complementares, o mRNA de um dado gene pode ser sintetizado utilizando-se qualquer uma das duas fitas como molde.

F. Um mRNA deve conter a sequência ATTGACCCCGGTCAA.

G. A quantidade de proteína presente em uma célula em um dado estado depende da taxa de síntese dessa proteína, de sua atividade catalítica e de sua taxa de degradação.

QUESTÃO 7-8

A proteína Lacheinmal é uma proteína hipotética que faz as pessoas sorrirem mais frequentemente. Ela se encontra inativa em muitos indivíduos cronicamente infelizes. O mRNA isolado a partir de diferentes pessoas infelizes pertencentes à mesma família revelou a ausência de um segmento interno ao gene de 173 nucleotídeos, o qual estava presente no mRNA Lacheinmal isolado a partir de um grupo-controle de pessoas geralmente felizes. A sequência do DNA do gene *Lacheinmal* de famílias felizes e infelizes foi determinada e comparada. Essas sequências diferiam em apenas um nucleotídeo, que se encontrava em um íntron. O que pode ser sugerido a respeito da base molecular da infelicidade nessa família?

(Dicas: [1] Você pode sugerir um mecanismo molecular pelo qual uma alteração em um único nucleotídeo de um gene pudesse causar a deleção observada no mRNA? Observe que essa é uma deleção *interna* ao mRNA. [2] Assumindo-se que as 173 bases deletadas removem sequências codificadoras do mRNA Lacheinmal, quais seriam as diferenças entre a proteína Lacheinmal de pessoas felizes e a de pessoas infelizes?)

QUESTÃO 7-9

Utilize o código genético ilustrado na Figura 7-24 para identificar quais das seguintes sequências nucleotídicas codificarão uma sequência polipeptídica arginina-glicina-aspartato:

A. 5′-AGA-GGA-GAU-3′

B. 5′-ACA-CCC-ACU-3′

C. 5′-GGG-AAA-UUU-3′

D. 5′-CGG-GGU-GAC-3′

QUESTÃO 7-10

"As ligações que se formam entre o anticódon de uma molécula tRNA e os três nucleotídeos de um códon sobre o mRNA são _________." Complete essa sentença com cada uma das opções seguintes e explique o porquê de as frases estarem corretas ou incorretas.

A. Ligações covalentes formadas por hidrólise de GTP.

B. Pontes de hidrogênio que se formam quando o tRNA está no sítio A.

C. Quebradas pela translocação do ribossomo sobre o mRNA.

QUESTÃO 7-11

Liste as definições comuns encontradas em dicionário para os termos *replicação, transcrição* e *tradução*. Ao lado de cada de-

finição, liste o significado específico de cada um desses termos aplicado a células vivas.

QUESTÃO 7-12

Em um mundo alienígena, o código genético é escrito em pares de nucleotídeos. Quantos aminoácidos esse código pode determinar? Em um mundo diferente, um código de tripletes é usado, mas a sequência dos nucleotídeos não é importante, sendo apenas considerada a presença ou ausência de cada tipo de nucleotídeo. Quantos aminoácidos esse código genético poderia determinar? Você poderia imaginar algum problema referente à tradução desses códigos?

QUESTÃO 7-13

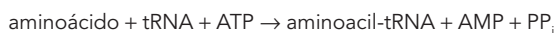
Uma característica impressionante do código genético é o fato de aminoácidos que apresentam propriedades químicas similares frequentemente possuírem códons similares. Desse modo, códons com U ou C como segundo nucleotídeo tendem a especificar aminoácidos hidrofóbicos. Você pode sugerir uma explicação plausível para esse fenômeno considerando a evolução inicial da maquinaria de síntese proteica?

QUESTÃO 7-14

Uma mutação no DNA gera um códon de terminação UGA no meio de um RNA que codifica uma determinada proteína. Uma segunda mutação nessa célula leva à alteração de um único nucleotídeo sobre um tRNA e permite a tradução correta da proteína; ou seja, essa segunda mutação "suprime" o defeito causado pela primeira. O tRNA alterado traduz o UGA como triptofano. Que alteração nucleotídica provavelmente ocorreu na molécula mutante de tRNA? Quais as consequências potenciais da presença de tal tRNA mutado na tradução dos genes normais dessa célula?

QUESTÃO 7-15

O carregamento de um tRNA com um aminoácido pode ser representado pela seguinte equação:

$$\text{aminoácido} + \text{tRNA} + \text{ATP} \rightarrow \text{aminoacil-tRNA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

onde PP_i representa o pirofosfato (ver Figura 3-40). No aminoacil-tRNA, o aminoácido e o tRNA estão ligados por uma ligação de alta energia; uma grande parte da energia derivada da hidrólise de ATP é estocada desse modo nessa ligação e está disponível para conduzir a formação de ligações peptídicas em estágios posteriores da síntese proteica. A alteração de energia livre da reação de carregamento ilustrada na equação é próxima de zero e, consequentemente, não se esperaria que favorecesse a associação do aminoácido ao tRNA. Que etapa suplementar que direcionaria a ocorrência da reação pode ser sugerida?

QUESTÃO 7-16

A. O peso molecular médio das proteínas de uma célula é de aproximadamente 30.000 dáltons. Algumas proteínas, no entanto, são muito maiores. A maior cadeia polipeptídica conhecida produzida por uma célula se refere à proteína denominada titina (produzida em células musculares de mamíferos), que possui um peso molecular de 3.000.000 de dáltons. Estime o tempo necessário para que uma célula muscular traduza uma molécula de mRNA que codifica a titina (considere o peso molecular médio de um aminoácido igual a 120 e uma taxa de tradução de dois aminoácidos por segundo para células eucarióticas).

B. A síntese proteica é bastante exata: é cometido apenas um erro a cada 10.000 aminoácidos unidos. Qual é a fração de moléculas proteicas de tamanho médio e de moléculas de titina que são sintetizadas sem qualquer erro? (Dica: a probabilidade *P* de obter uma proteína livre de erros é dada por $P = (1 - E)^n$, onde *E* é a taxa de erros e *n* o número de aminoácidos.)

C. O peso molecular combinado de todas as proteínas ribossomais eucarióticas é de aproximadamente $2{,}5 \times 10^6$ dáltons. Seria vantajoso sintetizá-las sob a forma de uma única proteína?

D. A transcrição ocorre a uma taxa de aproximadamente 30 nucleotídeos por segundo. Seria possível calcular o tempo necessário para a síntese do mRNA da titina a partir das informações anteriormente fornecidas?

QUESTÃO 7-17

Quais das seguintes alterações mutacionais podem ser consideradas como deletérias para um organismo? Justifique suas respostas.

A. Inserção de um único nucleotídeo próximo ao fim da sequência codificadora.

B. Deleção de um único nucleotídeo próximo ao início da sequência codificadora.

C. Deleção de três nucleotídeos consecutivos na região mediana da sequência codificadora.

D. Deleção de quatro nucleotídeos consecutivos na região mediana da sequência codificadora.

E. Substituição de um nucleotídeo por outro na região mediana da sequência codificadora.

CAPÍTULO 8

Controle da Expressão Gênica

O DNA de um organismo codifica todas as moléculas de RNA e proteína que são necessárias para fazer as suas células. No entanto, uma descrição completa da sequência de DNA de um organismo – seja ela de alguns milhões de nucleotídeos de uma bactéria, seja de poucos bilhões de nucleotídeos de cada célula humana – seria capaz de nos auxiliar a reconstruir um organismo tanto quanto uma lista de palavras em inglês em um dicionário nos tornaria capazes de reconstruir uma peça de Shakespeare. Precisamos saber como os elementos em uma sequência de DNA ou palavras em uma lista funcionam juntas para produzir uma obra-prima.

Em biologia celular,a questão se reduz à **expressão gênica**. Mesmo a bactéria unicelular mais simples pode usar os seus genes seletivamente – por exemplo, ativando e inibindo genes de maneira a produzir enzimas necessárias para digerir diferentes fontes de alimento disponíveis. Em plantas e animais multicelulares, a expressão gênica está sob um controle mais elaborado. Durante o desenvolvimento embrionário, um óvulo fertilizado origina muitos tipos celulares que diferem drasticamente tanto em estrutura como em função. As diferenças entre um neurônio e um linfócito de mamíferos, por exemplo, são tão extremas que é difícil imaginar que as duas células contenham o mesmo DNA (**Figura 8-1**). Por essa razão, e porque as células em um organismo adulto raramente perdem as suas características distintivas, os biólogos suspeitaram que os genes deveriam ser inicialmente perdidos quando uma célula se tornava especializada. Sabemos hoje, entretanto, que todas as células de um organismo multicelular contêm o mesmo genoma. A *diferenciação* celular é, em vez disso, obtida por mudanças na expressão gênica.

Centenas de tipos celulares diferentes desempenham uma ampla gama de funções especializadas que dependem de genes que somente são ativados naquele tipo celular: por exemplo, as células β do pâncreas produzem o hormônio proteico insulina, e as células α do pâncreas produzem o hormônio glucagon. Os linfócitos do sistema imune são as únicas células no corpo a fazer anticorpos,

Figura 8-1 **Um neurônio e um linfócito compartilham o mesmo genoma.** Os longos galhos desse neurônio da retina possibilitam a ele receber sinais elétricos de muitas células e carregar esses sinais para muitas células vizinhas. O linfócito é uma célula branca envolvida na resposta imune à infecção (observe a escala) e move-se livremente pelo corpo. Ambas as células contêm o mesmo genoma, mas elas expressam RNAs e proteínas diferentes. (Neurônio de B.B. Boycott em Essays on the Nervous System [R. Bellairs e E.G. Gray, eds.]. Oxford, U.K.: Clarendon Press, 1974. Com permissão de Oxford University Press.)

e as hemácias em desenvolvimento são as únicas células no corpo que produzem a proteína de transporte de oxigênio hemoglobina. As diferenças entre um neurônio, um linfócito, uma célula do pâncreas e uma hemácia dependem de um controle preciso da expressão gênica. Em cada caso, a célula está usando somente alguns dos genes do seu repertório total.

Neste capítulo, discutiremos as principais maneiras pelas quais a expressão gênica é controlada nas células bacterianas e eucarióticas. Embora alguns mecanismos de controle se apliquem a ambos os tipos de células, as células eucarióticas, pela sua estrutura cromossomal mais complexa, possuem maneiras de controlar a expressão gênica que não estão disponíveis em bactérias.

UMA VISÃO GERAL DA EXPRESSÃO GÊNICA

Como uma célula individual especifica quais dos seus muitos milhares de genes serão expressos em proteínas? Decidir quais genes devem ser expressos é um problema especialmente importante para os organismos multicelulares, porque, durante o desenvolvimento animal, tipos celulares, como músculos, nervos e células do sangue, tornam-se diferentes uns dos outros, levando finalmente à ampla variação de tipos celulares vista no adulto. Essa **diferenciação** surge porque as células produzem e acumulam diferentes conjuntos de moléculas de RNA e proteína, ou seja, elas expressam genes diferentes.

Os diferentes tipos celulares de um organismo multicelular contêm o mesmo DNA

Como discutido, as células possuem a habilidade de modificar os genes que elas expressam sem alterar a sequência nucleotídica do seu DNA. Como sabemos disso? Se o DNA foi alterado irreversivelmente durante o desenvolvimento, os cromossomos de uma célula diferenciada seriam incapazes de guiar o desenvolvimento de todo o organismo. Para testar essa ideia, um núcleo de uma célula da pele de uma rã adulta foi injetado em um ovo de rã cujo núcleo próprio havia sido removido. Em pelo menos alguns casos, o ovo desenvolveu-se normalmente, indicando que o núcleo da célula da pele transplantada não pode ter perdido nenhuma sequência de DNA fundamental (**Figura 8-2**). Tais experimentos de transplante nuclear também têm sido feitos com sucesso usando células diferenciadas retiradas de mamíferos adultos, incluindo-se ovelhas, vacas, porcos, cabras e camundongos. Em plantas, células individuais removidas a partir de uma cenoura, por exemplo, podem resultar na regeneração de uma planta de cenoura adulta inteira. Esses experimentos mostram que o DNA de tipos celulares especializados ainda contém o conjunto de instruções completo necessário para formar um organismo inteiro. As células de um organismo, dessa forma, diferem não porque elas contêm genes diferentes, mas porque elas os expressam diferentemente.

Diferentes tipos celulares produzem diferentes conjuntos de proteínas

A extensão das diferenças na expressão gênica entre diferentes tipos celulares pode ser avaliada de forma aproximada pela comparação da composição proteica das células do fígado, coração, cérebro, e assim por diante, usando a técnica de eletroforese em gel bidimensional (ver Painel 4-6, p. 167). Experimentos desse tipo revelam que muitas proteínas são comuns para todas as células de um organismo multicelular. Essas proteínas de manutenção, ou *housekeeping,* incluem as proteínas estruturais dos cromossomos, RNA-polimerases, enzimas de reparação de DNA, proteínas dos ribossomos, enzimas envolvidas na glicólise e outros processos metabólicos básicos e muitas das proteínas que formam o citoesqueleto. Cada tipo celular diferente também produz proteínas

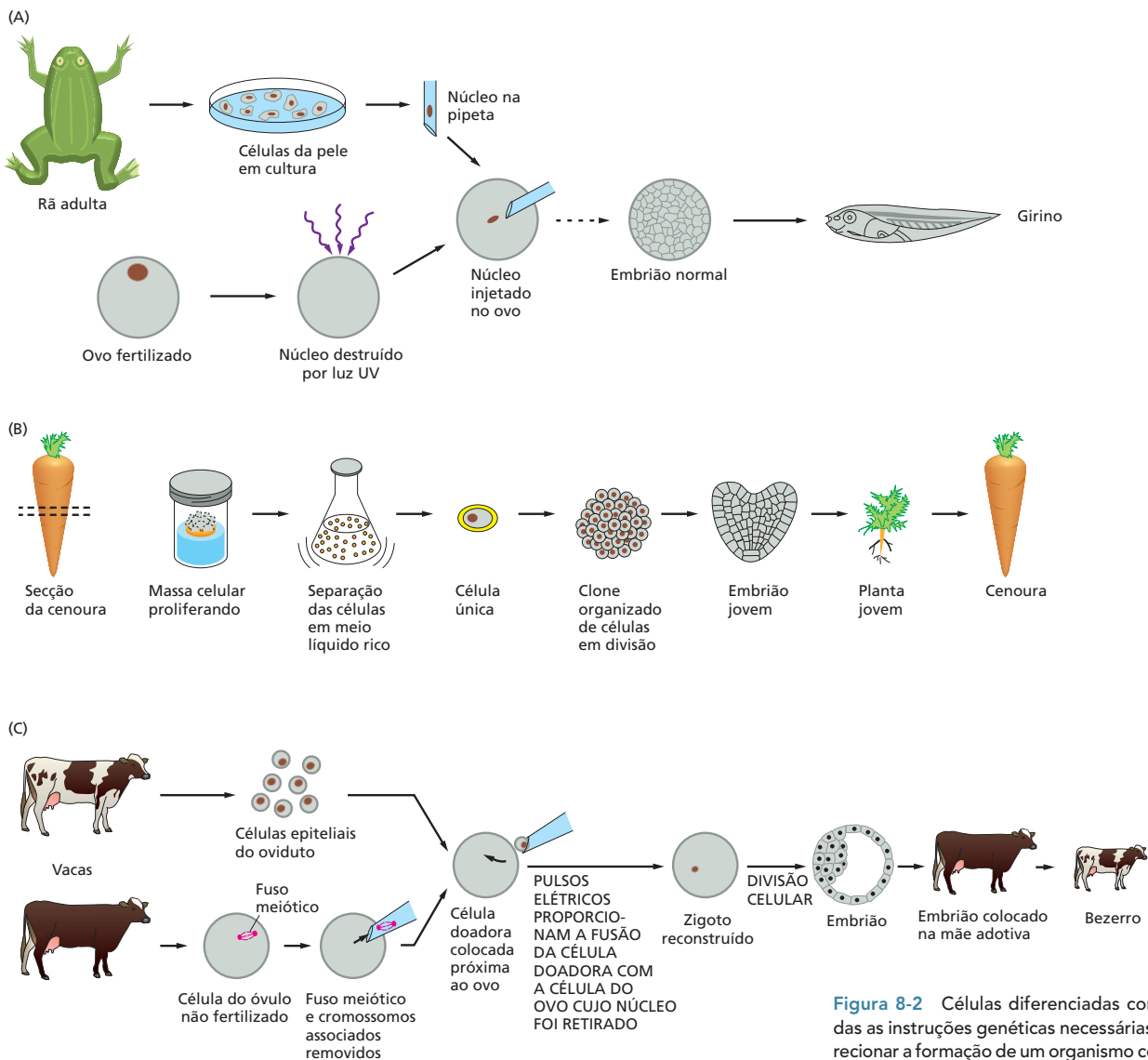



Figura 8-2 Células diferenciadas contêm todas as instruções genéticas necessárias para direcionar a formação de um organismo completo. (A) O núcleo de uma célula da pele de uma rã adulta transplantado em um ovo que teve seu núcleo retirado pode dar origem a um girino completo. A seta falhada indica que, para dar ao genoma transplantado tempo para ajustar-se ao meio embrionário, um passo de transferência adicional é necessário, no qual um dos núcleos é retirado do embrião inicial que começa o seu desenvolvimento e é recolocado em um segundo ovo que teve o núcleo retirado. (B) Em muitos tipos de plantas, as células diferenciadas retêm a habilidade de "desdiferenciarem-se", de forma que uma única célula pode formar um clone de células progenitoras que, mais tarde, darão origem a uma planta completa. (C) Uma célula diferenciada de uma vaca adulta introduzida em um óvulo de uma vaca diferente, que teve seu núcleo retirado, pode dar origem a um bezerro. Bezerros diferentes produzidos a partir da mesma célula diferenciada doadora são geneticamente idênticos e são, dessa maneira, clones uns dos outros. (A, modificada de J.B. Gurdon, *Sci. Am.* 219(6): 24-35, 1968. Com permissão de Estate of Bunji Tagawa.)

especializadas que são responsáveis pelas propriedades distintivas das células. Nos mamíferos, por exemplo, a hemoglobina é feita em reticulócitos, as células que se desenvolvem em hemácias, mas ela não é detectada em nenhum outro tipo celular.

Muitas proteínas em uma célula são produzidas em números tão pequenos que elas não podem ser detectadas pela técnica de eletroforese em gel. Uma técnica mais sensível, chamada de espectrometria de massa (ver Figura 4-45), pode ser usada para detectar proteínas raras, bem como fornece informação se as proteínas estão covalentemente modificadas (p. ex., por fosforilação). A expressão de genes pode também ser estudada monitorando-se os mRNAs que codificam tais proteínas mais do que as proteínas propriamente ditas. Estimativas a respeito do número das diferentes sequências de mRNA nas células humanas sugerem que, em um dado momento, uma célula humana diferenciada típica expresse talvez 5.000-15.000 genes a partir de um repertório ao redor de 25.000. É a expressão de uma coleção diferente de genes em cada tipo celular que causa as grandes variações vistas em tamanho, forma, comportamento e função das células diferenciadas.

Uma célula pode mudar a expressão dos seus genes em resposta a sinais externos

A maioria das células especializadas em um organismo multicelular é capaz de alterar seus padrões de expressão gênica em resposta a sinais extracelulares. Se uma célula do fígado é exposta, por exemplo, a um hormônio glicocorticoide (um tipo de esteroide), a produção de várias proteínas específicas é aumentada drasticamente. Glicocorticoides são liberados no corpo durante períodos de inanição ou exercício intenso e sinalizam ao fígado para aumentar a produção de glicose a partir de aminoácidos e outras pequenas moléculas; o conjunto de proteínas cuja produção é induzida inclui enzimas como a tirosina-aminotransferase, a qual auxilia na conversão de tirosina à glicose. Quando o hormônio não está mais presente, a produção dessas proteínas diminui para o seu nível normal.

Outros tipos celulares respondem aos glicocorticoides diferentemente. Nas células adiposas, por exemplo, a produção de tirosina-aminotransferase é reduzida, ao passo que alguns outros tipos celulares simplesmente não respondem aos glicocorticoides. Esses exemplos ilustram a característica geral da especialização celular: diferentes tipos celulares frequentemente respondem de maneiras diversas para o mesmo sinal extracelular. Ressaltando esses ajustes que ocorrem em resposta aos sinais extracelulares, existem características dos padrões de expressão gênica que não são alterados e conferem permanentemente a cada tipo celular sua característica distintiva.

A expressão gênica pode ser regulada em muitas das etapas na via que vai do DNA para o RNA até a proteína

Se as diferenças entre os vários tipos celulares de um organismo dependem de genes particulares que a célula expressa, em qual nível o controle da expressão gênica é exercido? Como vimos no último capítulo, existem muitos passos no caminho que leva do DNA à proteína, e todos eles podem, em princípio, ser regulados. Portanto, uma célula pode controlar as proteínas que produz por (1) controle de quando e quão frequentemente um determinado gene é transcrito, (2) controle de como a transcrição de RNA é submetida a *splicing* ou de alguma outra maneira processada, (3) seleção de quais mRNAs são exportados do núcleo para o citosol, (4) degradação seletiva de certas moléculas de mRNAs, (5) seleção de quais mRNAs são traduzidos por ribossomos, ou (6) ativação ou inativação seletiva de proteínas após a sua produção (**Figura 8-3**).

A expressão de genes pode ser regulada a cada um desses passos, e, neste capítulo, descreveremos alguns pontos-chave no controle no caminho que leva do DNA à proteína. Para muitos genes, entretanto, o controle da transcrição (etapa número 1 na Figura 8-3) é majoritário. Isso faz sentido porque somente o controle transcricional pode garantir que nenhum intermediário não essencial seja sintetizado. Então, é a regulação da transcrição – e os componentes do DNA e das proteínas que determinam quais genes uma célula transcreve em RNA – que nos direcionaremos primeiro.

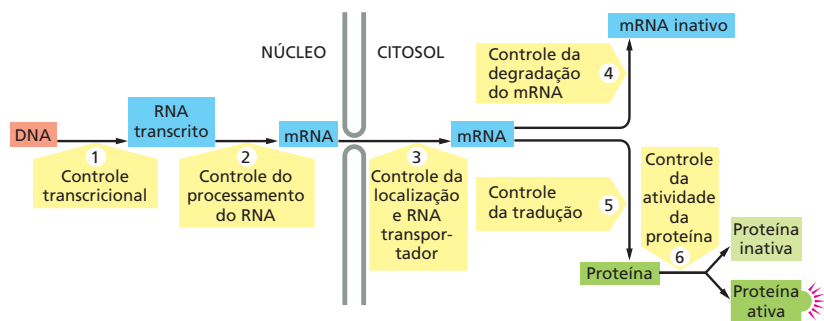



Figura 8-3 **A expressão de genes eucarióticos pode ser controlada em diferentes passos.** Exemplos de regulação em cada um dos passos são conhecidos, embora, para muitos genes, o principal sítio de controle seja o passo 1: transcrição de uma sequência de DNA em RNA.

COMO FUNCIONAM OS COMUTADORES TRANSCRICIONAIS

Há apenas 50 anos, a ideia de que os genes poderiam ser ativados e desativados era revolucionária. Esse conceito foi um grande avanço e surgiu originalmente a partir dos estudos de como as bactérias *E. coli se* adaptam a mudanças na composição de seu meio de cultura. Muitos dos mesmos princípios se aplicam às células eucarióticas. Entretanto, a enorme complexidade da regulação gênica nos organismos superiores, combinada com o empacotamento do seu DNA na cromatina, cria desafios especiais e novas oportunidades de controle, como veremos mais adiante. Iniciaremos com uma discussão sobre *reguladores da transcrição,* proteínas que controlam a expressão no nível da transcrição.

A transcrição é controlada por proteínas que se ligam em sequências regulatórias de DNA

O controle da transcrição é normalmente exercido na etapa na qual o processo é iniciado. No Capítulo 7, vimos que a região promotora de um gene atrai a enzima RNA-polimerase e orienta corretamente a enzima a iniciar sua tarefa de fazer uma cópia de RNA do gene. Os promotores, tanto dos genes bacterianos quanto dos eucarióticos, incluem um *sítio de iniciação*, onde a transcrição na verdade se inicia, e uma sequência de aproximadamente 50 nucleotídeos que se estende a montante do sítio de iniciação (comparando-se a direção da transcrição ao fluxo de um rio). Essa região contém sítios que são necessários para que a RNA-polimerase se ligue ao promotor. Além do promotor, praticamente todos os genes, tanto bacterianos como eucarióticos, possuem **sequências regulatórias de DNA** que são usadas para ativar ou desativar o gene.

Algumas sequências regulatórias de DNA são curtas, na ordem de 10 pares de nucleotídeos, e atuam como comutadores genéticos simples que respondem a um único sinal. Tais comutadores simples predominam em bactérias. Outras sequências regulatórias de DNA, especialmente as de eucariotos, são muito longas (algumas vezes com mais de 10.000 pares de bases) e atuam como microprocessadores moleculares, respondendo a uma variedade de sinais que elas integram em uma instrução que determina quão frequentemente a transcrição é iniciada.

Sequências regulatórias de DNA não trabalham sozinhas. Para funcionarem, essas sequências precisam ser reconhecidas por proteínas chamadas de **reguladores transcricionais** que se ligam ao DNA. É a combinação de uma sequência de DNA e as suas moléculas de proteína associadas que atua como o comutador de controle da transcrição. Uma simples bactéria codifica centenas de reguladores transcricionais, cada uma delas reconhecendo uma sequência de DNA diferente e assim regulando distintos conjuntos de genes. Humanos codificam muito mais – milhares –, significando a importância e a complexidade da regulação gênica para produzir um organismo complexo.

Proteínas que reconhecem uma sequência específica de DNA o fazem porque a superfície da proteína se combina fortemente com as características de superfície especiais da dupla-hélice naquela região. Essas características irão variar dependendo da sequência de nucleotídeos, e assim proteínas diferentes irão reconhecer diferentes sequências de nucleotídeos. Na maioria dos casos, a proteína se insere dentro do sulco maior da dupla-hélice (ver Figura 5-7) e faz uma série de contatos moleculares com os pares de bases. A proteína forma pontes de hidrogênio, ligações iônicas e interações hidrofóbicas com as bordas das bases, normalmente sem destruir as pontes de hidrogênio com as bordas que mantêm as bases unidas (**Figura 8-4**). Embora cada contato individual seja fraco, os 20 ou tantos contatos que são tipicamente formados em uma interface proteína-DNA se combinam para garantir que a interação seja tanto altamente específica quanto muito forte. De fato, as interações proteína-DNA estão entre as interações moleculares mais fortes e específicas conhecidas na biologia.

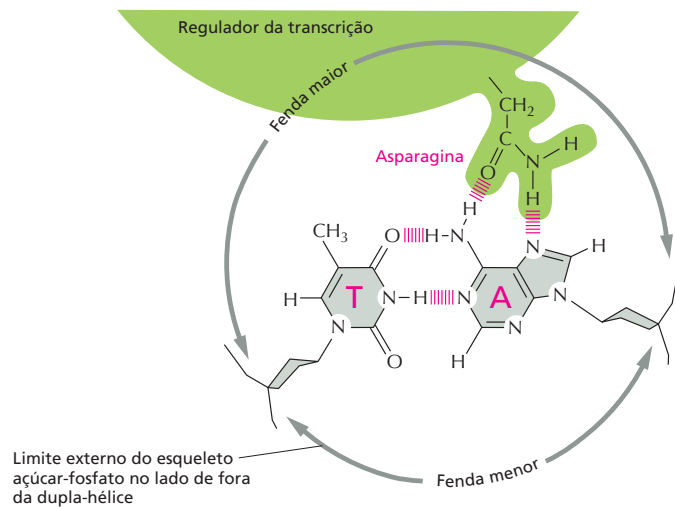
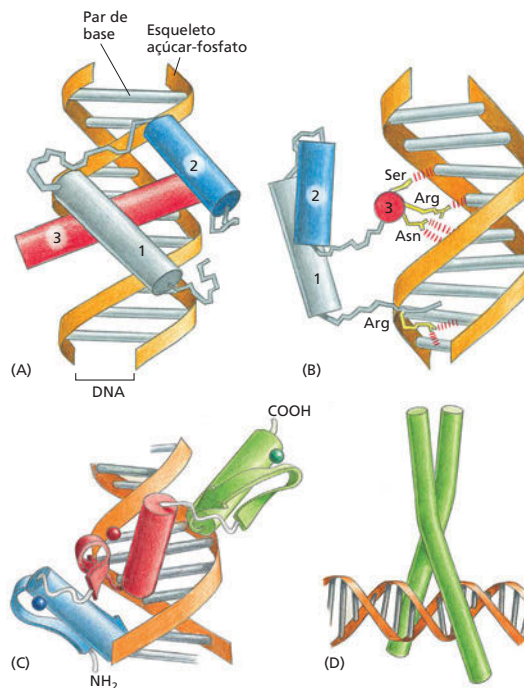
Figura 8-4 Um regulador transcricional se liga ao sulco maior da hélice do DNA. Um único contato entre a proteína e um par de bases no DNA é mostrado. Normalmente, a interface proteína-DNA consistiria em 10-20 de tais contatos, cada um envolvendo um aminoácido diferente e cada um contribuindo para a força da interação proteína-DNA.

Embora cada exemplo de reconhecimento proteína-DNA seja único no detalhe, muitas das proteínas responsáveis pela regulação gênica reconhecem o DNA por meio de um dos muitos motivos estruturais. Esses se encaixam no sulco maior da dupla-hélice de DNA e formam associações íntimas com um curto trecho de pares de bases de DNA. Os *motivos de ligação a DNA* mostrados na **Figura 8-5** – o homeodomínio, o dedo-de-zinco e o zíper-de-leucina – são encontrados em reguladores transcricionais que controlam a expressão de milhares de genes diferentes em praticamente todos os organismos eucarióticos. Frequentemente, as proteínas de ligação ao DNA se ligam em pares (dímeros) à hélice de DNA. A dimerização aproximadamente duplica a área de contato com o DNA, aumentando, assim, a força e a especificidade da interação proteína-DNA. Como as duas proteínas diferentes podem combinar-se em pares, a dimerização também torna possível a muitas sequências de DNA diferentes serem reconhecidas por um número limitado de proteínas.

Figura 8-5 Reguladores transcricionais contêm uma variedade de motivos de ligação ao DNA. (A e B) Vistas frontal e lateral do *homeodomínio* – um motivo estrutural de muitas proteínas eucarióticas de ligação a DNA (**Animação 8.1**). Ele consiste em três α-hélices consecutivas, as quais são mostradas como *cilindros* nesta figura. A maioria dos contatos com as bases de DNA é feita pela hélice 3 (a qual é vista internamente em B). A asparagina (Asn) nessa hélice faz contato com uma adenina da maneira mostrada na Figura 8-4. (C) O motivo *dedo-de-zinco* consiste em uma α-hélice e uma folha β pregueada (a última mostrada como uma *seta curva*) mantidas unidas por uma molécula de zinco (indicada por *esferas coloridas*). Os dedos-de-zinco são, com frequência, encontrados em grupos unidos covalentemente, de modo a permitir que a α-hélice de cada dedo faça contato com as bases de DNA do sulco maior (**Animação 8.2**). A ilustração mostra aqui um grupo de três dedos-de-zinco. (D) O motivo *zíper-de-leucina*. Esse motivo de ligação ao DNA é formado por duas α-hélices, cada uma fornecida por uma molécula de proteína diferente. Proteínas zíper-de-leucina se ligam ao DNA como dímeros, segurando a dupla-hélice como um prendedor em um varal de roupas (**Animação 8.3**).

Cada motivo faz muitos contatos com o DNA. Para simplificar, apenas os contatos por pontes de hidrogênio são mostrados em (B), e nenhum dos contatos individuais proteína-DNA são mostrados em (C) e (D).

Comutadores da transcrição permitem às células responderem a mudanças no ambiente

Os exemplos mais simples e mais completamente entendidos de regulação gênica ocorrem em bactérias e nos vírus que as infectam. O genoma da bactéria *E. coli* consiste em uma única molécula circular de DNA de aproximadamente $4,6 \times 10^6$ pares de nucleotídeos. Esse DNA codifica aproximadamente 4.300 proteínas, embora apenas uma fração delas seja sintetizada de cada vez. As bactérias regulam a expressão de muitos dos seus genes de acordo com as fontes de alimento disponíveis no ambiente. Por exemplo, em *E. coli,* cinco genes codificam para enzimas que produzem o aminoácido triptofano. Esses genes estão arranjados em conjunto no cromossomo e são transcritos a partir de um único promotor como uma longa molécula de mRNA a partir da qual as cinco proteínas são traduzidas (**Figura 8-6**). Quando o triptofano está presente nas adjacências e entra na célula bacteriana, essas enzimas não são mais necessárias, e a sua produção é desligada. Essa situação surge, por exemplo, quando uma bactéria está no intestino de um mamífero que acabou de comer uma refeição rica em proteína. Esses cinco genes expressos coordenadamente são parte de um *óperon* – um conjunto de genes que é transcrito em um único mRNA. Óperons são comuns em bactérias, mas não são encontrados em eucariotos, onde os genes são transcritos e regulados individualmente (ver Figura 7-36).

Hoje entendemos consideravelmente os detalhes de como o óperon do triptofano funciona. Dentro do promotor está uma pequena sequência de DNA (15 nucleotídeos de comprimento) que é reconhecida por uma proteína de regulação gênica. Quando a proteína de regulação gênica se liga a essa sequência nucleotídica, denominada *operador,* ela bloqueia o acesso da RNA-polimerase ao promotor; isso impede a transcrição do óperon e a produção das enzimas produtoras de triptofano. Essa proteína de regulação gênica é conhecida como o *repressor do triptofano* e é regulada de forma engenhosa: o repressor pode ligar-se ao DNA somente se ele estiver também ligado a várias moléculas do aminoácido triptofano (**Figura 8-7**).

O repressor do triptofano é uma proteína alostérica (ver Figura 4-37): a ligação do triptofano induz uma sutil alteração na sua estrutura tridimensional de maneira que ela pode agora ligar-se ao operador de DNA. Quando a concentração de triptofano livre na célula cai, o repressor não mais se liga ao triptofano e, assim, não mais se liga ao DNA, e o óperon do triptofano é transcrito. O repressor é, dessa forma, um simples mecanismo que ativa e desativa a produção de um conjunto de enzimas biossintéticas de acordo com a disponibilidade do produto final da via que as enzimas catalisam.

A bactéria pode responder muito rapidamente ao aumento na concentração do triptofano, porque a própria proteína repressora do triptofano está sempre presente na célula. O gene que a codifica é continuamente transcrito em um nível baixo, de maneira que uma pequena quantidade da proteína repressora está sempre sendo produzida. Tal expressão gênica não regulada é conhecida como expressão gênica *constitutiva.*

QUESTÃO 8-1

Bactérias podem pegar o aminoácido triptofano (Trp) do ambiente, ou se há um suprimento ineficiente externo, elas podem sintetizar o triptofano a partir de outras pequenas moléculas. O repressor Trp é uma proteína reguladora da transcrição que inativa a transcrição de genes que codificam para enzimas necessárias para a síntese do triptofano (ver Figura 8-7).

A. O que aconteceria com a regulação do óperon triptofano em células que expressam uma forma mutante do repressor do triptofano que (1) não pode ligar-se ao DNA, (2) não pode ligar-se ao triptofano, ou (3) se liga ao DNA mesmo na ausência de triptofano?

B. O que aconteceria nos cenários (1), (2), e (3) se a célula, além disso, produzisse a proteína repressora do triptofano normal, de um segundo gene normal?

Repressores inativam genes, ativadores ativam genes

O repressor do triptofano, como o seu nome sugere, é uma **proteína repressora**: na sua forma ativa, ela desliga os genes, ou os *reprime.* Outras protei-

Figura 8-6 Um conjunto de genes bacterianos pode ser transcrito a partir de um único promotor. Cada um desses cinco genes codifica uma enzima diferente; todas as enzimas são necessárias para a síntese do aminoácido triptofano. Os genes são transcritos como uma única molécula de mRNA, uma característica que permite que a sua expressão seja controlada coordenadamente. Conjuntos de genes transcritos como uma única molécula de mRNA são comuns em bactérias. Cada um desses conjuntos é chamado de *óperon;* a expressão do óperon do triptofano mostrada aqui é controlada em uma sequência regulatória chamada de *operador,* situada dentro do promotor.

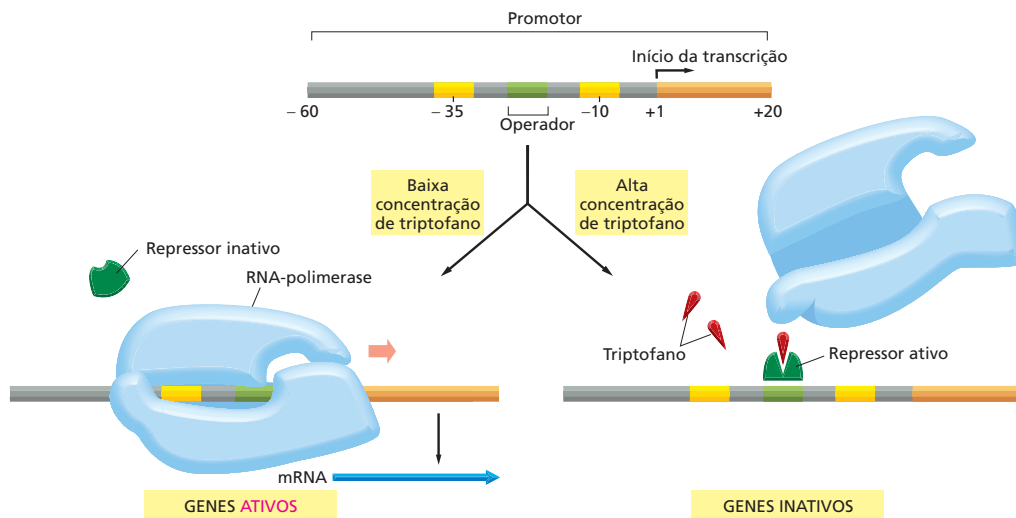



Figura 8-7 Os genes podem ser ativados e desativados com proteínas repressoras. Se a concentração de triptofano dentro da célula está baixa, a RNA-polimerase *(azul) se* liga ao promotor e transcreve os cinco genes do óperon do triptofano *(esquerda).* Se a concentração do triptofano está alta, entretanto, a proteína repressora *(verde-escuro) se* torna ativa e se liga ao operador *(verde-claro),* bloqueando a ligação da RNA polimerase ao promotor *(direita).* Sempre que a concentração de triptofano intracelular diminui, o repressor libera o seu triptofano e se desliga do DNA, permitindo que a polimerase transcreva novamente o óperon. O promotor está indicado por dois blocos-chave de informação na sequência de DNA, as regiões –35 e –10, destacadas em *amarelo* (ver Figura 7-10). O óperon completo é mostrado na Figura 8-6.

nas de regulação gênica bacterianas operam de maneira oposta: ligando os genes ou *ativando-os.* Essas **proteínas ativadoras** atuam nos promotores que – ao contrário do promotor para o operador do triptofano – são, por si próprios, apenas marginalmente hábeis a ligarem-se e a posicionarem-se na RNA-polimerase; elas podem, por exemplo, ser apenas fracamente reconhecidas pela polimerase. Entretanto, esses promotores fracamente funcionais podem tornar-se totalmente funcionais por proteínas ativadoras que se ligam a sítios próximos no DNA e fazem contatos com a RNA-polimerase de maneira que a auxiliam a iniciar a transcrição (Figura 8-8). Em alguns casos, proteínas bacterianas reguladoras da transcrição podem reprimir a transcrição em um promotor e ativar a transcrição em outro; se a proteína regulatória funciona como um ativador ou repressor depende, em grande parte, onde exatamente está localizada a sequência regulatória a qual se ligará, com respeito ao promotor.

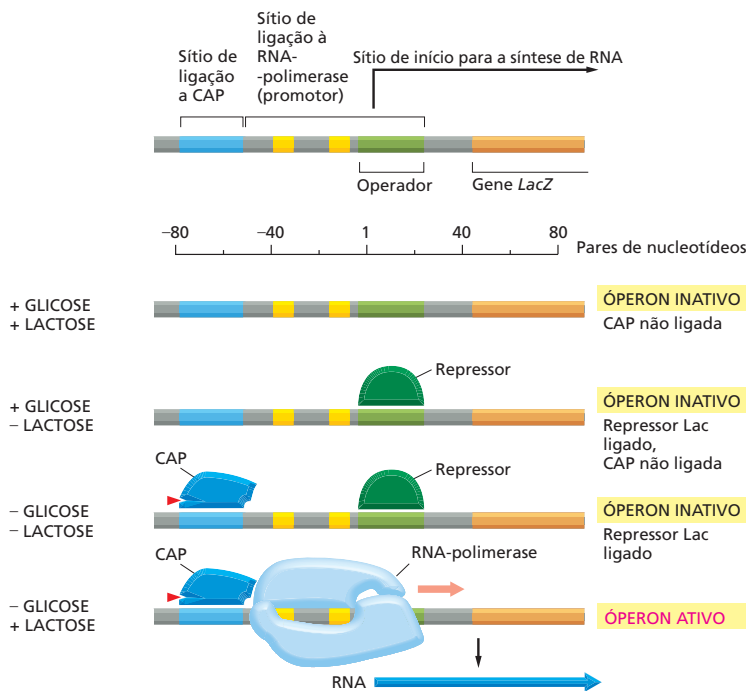
Como o repressor do triptofano, proteínas ativadoras frequentemente interagem com uma segunda molécula para ligar-se ao DNA. Por exemplo, a proteína ativadora bacteriana CAP tem de ligar-se ao AMP cíclico (cAMP) antes que possa ligar-se ao DNA. Genes ativados por CAP são estimulados em resposta a um aumento da concentração intracelular de cAMP, o qual sinaliza

Figura 8-8 A expressão de genes pode também ser controlada com proteínas ativadoras. Uma proteína ativadora se liga a uma sequência regulatória de DNA e então interage com a RNA-polimerase para auxiliar na iniciação da transcrição. Sem a presença do ativador, o promotor falha em iniciar a transcrição eficientemente. Em bactérias, a ligação do ativador ao DNA é frequentemente controlada pela interação de um metabólito ou outra pequena molécula (triângulo *vermelho*) com a proteína ativadora. Por exemplo, a proteína ativadora de genes por catabólitos (CAP) bacteriana se liga ao AMP cíclico (cAMP) antes de ligar-se ao DNA; então, CAP proporciona que genes respondam ao aumento intracelular da concentração de cAMP.

para a bactéria que a glicose, a sua fonte de carbono preferida, não está mais disponível; como resultado, enzimas capazes de degradar outros açúcares são produzidas.

Um ativador e um repressor controlam o óperon *Lac*

Em muitos momentos, a atividade de um único promotor pode ser controlada por dois sinais diferentes. O óperon *Lac* em *E. coli,* por exemplo, é controlado tanto pelo repressor Lac como pela proteína ativadora CAP. O óperon *Lac* codifica as proteínas necessárias para importar e digerir o dissacarídeo lactose. Na ausência de glicose, a fonte de carbono preferida da célula, a CAP ativa os genes que a célula utiliza como fontes alternativas de carbono – incluindo a lactose. Seria um desperdício, entretanto, para CAP induzir a expressão do óperon *Lac* quando a lactose não estivesse presente. Assim, o repressor Lac assegura que o óperon está desligado na ausência de lactose. Esse arranjo possibilita à região controladora do óperon *Lac* responder e integrar dois sinais diferentes, de maneira que o óperon seja altamente expresso somente quando as duas condições são atingidas: a lactose precisa estar presente e a glicose precisa estar ausente (**Figura 8-9**). Esse circuito genético se comporta como um comutador que conduz uma operação lógica em um computador. Quando a lactose está presente e a glicose ausente, a célula executa o programa apropriado: nesse caso, a transcrição dos genes que permitam a utilização da lactose.

A lógica elegante do óperon *Lac* atraiu primeiro a atenção de biólogos há mais de 50 anos. A base molecular do comutador foi descoberta por uma combinação de genética e bioquímica, fornecendo o primeiro indício de como a expressão gênica é controlada. Em células eucarióticas, as mesmas estratégias básicas são combinadas para gerar um circuito mais complexo. O programa de desenvolvimento que conduz um ovo fertilizado à fase adulta pode ser visto como um circuito excessivamente complexo formado por componentes simples como aqueles que controlam os óperons *Lac* e triptofano.

QUESTÃO 8-2

Explique como as proteínas de ligação ao DNA podem fazer contatos sequência-específicos com um DNA de fita dupla sem quebrarem as pontes de hidrogênio que mantêm as bases unidas. Indique como, fazendo tais contatos, uma proteína pode distinguir um par T-A de um C-G. Dê a sua resposta em uma forma semelhante à da Figura 8-4 e indique quais tipos de ligações não covalentes – pontes de hidrogênio, atrações eletrostáticas, ou interações hidrofóbicas (ver Painel 2-7, p. 76-77) – seriam feitas. Não há necessidade de especificar qualquer aminoácido particular na proteína. As estruturas de todos os pares de bases no DNA foram indicadas na Figura 5-6.

Figura 8-9 O óperon *Lac* é controlado por dois sinais. Os níveis de glicose e lactose controlam o início da transcrição do óperon *Lac* pelos seus efeitos sobre a proteína repressora *Lac* e CAP. Quando a lactose está ausente, o repressor Lac se liga ao operador *Lac* impedindo a expressão do óperon. A adição de lactose aumenta a concentração intracelular de um composto relacionado, a alolactose. A alolactose se liga à proteína repressora causando uma modificação conformacional que a remove do DNA operador (não mostrado). Quando a glicose está ausente, o AMP cíclico *(triângulo vermelho)* é produzido pela célula e CAP se liga ao DNA. *LacZ,* o primeiro gene do óperon, codifica a enzima β-galactosidase, a qual quebra a lactose em galactose e glicose.

Os reguladores transcricionais eucarióticos controlam a expressão gênica à distância

Eucariotos também usam reguladores transcricionais – ativadores e repressores – para regularem a expressão dos seus genes. Os sítios de DNA aos quais os ativadores gênicos eucarióticos se ligam foram originalmente denominados *estimuladores,* porque a sua presença drasticamente "estimulava", ou aumentava, a taxa de transcrição. Foi surpreendente para os biólogos quando, em 1979, foi descoberto que essas proteínas ativadoras poderiam estar ligadas a milhares de pares de nucleotídeos à distância do promotor. Além disso, os ativadores eucarióticos poderiam influenciar a transcrição de um gene quando ligado acima ou abaixo dele. Essas observações levantaram muitas questões. Como sequências estimuladoras e as proteínas ligadas a elas funcionam através dessas longas distâncias? Como elas se comunicam com o promotor?

Muitos modelos para a "ação à distância" têm sido propostos, mas o mais simples deles parece aplicar-se à maioria dos casos. O DNA entre o estimulador e o promotor forma uma alça para permitir que as proteínas ativadoras influenciem diretamente eventos que ocorram no promotor (**Figura 8-10**). O DNA, dessa forma, atua como uma corda, induzindo uma proteína ligada a um estimulador, mesmo a milhares de pares de nucleotídeos de distância, a interagir com as proteínas na vizinhança do promotor – incluindo a RNA-polimerase II e fatores gerais da transcrição (ver Figura 7-12). Frequentemente, proteínas adicionais servem para interligar os reguladores transcricionais distantes ao promotor; o mais importante é um grande complexo de proteínas conhecido como *Mediador* (ver Figura 8-10). Umas das maneiras pelas quais as proteínas ativadoras eucarióticas funcionam é ajudando na associação dos fatores gerais de transcrição e da RNA-polimerase ao promotor. As proteínas repressoras eucarióticas podem fazer o oposto: elas podem diminuir a transcrição impedindo ou sabotando a associação do mesmo complexo proteico.

Além de ativar – ou reprimir – a associação do complexo de início da transcrição, proteínas eucarióticas reguladoras da transcrição possuem um mecanismo adicional de ação: elas atraem as proteínas que modulam a estrutura da cromatina e afetam assim a acessibilidade do promotor aos fatores gerais de transcrição e à RNA-polimerase, como discutido a seguir.

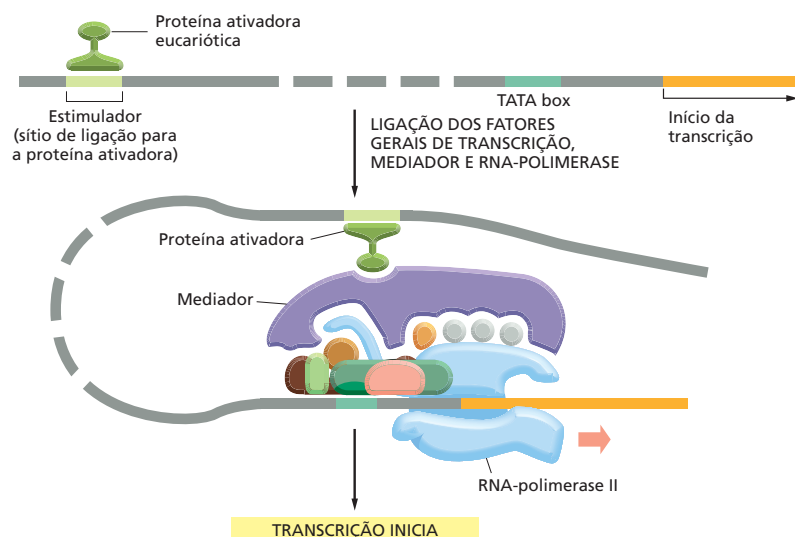
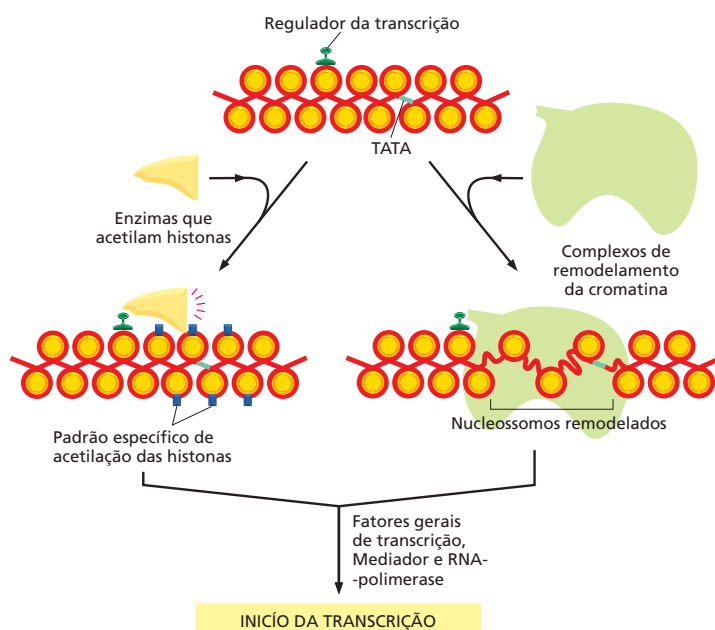



Figura 8-10 Em eucariotos, a ativação gênica ocorre à distância. Uma proteína ativadora ligada ao DNA atrai a RNA-polimerase e fatores gerais de transcrição (ver Figura 7-12) ao promotor. A formação da alça pelo DNA permite o contato entre a proteína ativadora ligada ao estimulador e o complexo transcricional ligado ao promotor. No caso mostrado aqui, um grande complexo proteico chamado de Mediador serve como intermediário. A região quebrada de DNA significa que o comprimento do DNA entre o estimulador e o início da transcrição varia, algumas vezes alcançando dezenas de milhares de pares de nucleotídeos de comprimento.

O empacotamento de um promotor de DNA em nucleossomos pode afetar o início da transcrição

O início da transcrição nas células eucarióticas precisa levar em conta o empacotamento do DNA em cromossomos. Como vimos no Capítulo 5, o material genético nas células eucarióticas está empacotado nos nucleossomos, os quais, por sua vez, estão empacotados em estruturas de grandeza maior. Como os reguladores transcricionais, fatores gerais de transcrição e RNA-polimerase ganham acesso a esses DNAs? Os nucleossomos podem inibir o início da transcrição se eles estiverem posicionados sobre o promotor, provavelmente porque eles, de forma física, bloqueiam a associação dos fatores gerais de transcrição ou da RNA-polimerase sobre o promotor. De fato, tal empacotamento da cromatina pode ter evoluído em parte para impedir a expressão gênica vazante – início da transcrição na ausência das proteínas ativadoras apropriadas.

Nas células eucarióticas, as proteínas ativadoras e repressoras exploram a estrutura da cromatina para auxiliar os genes a serem ativados e desativados. Como vimos no Capítulo 5, a estrutura da cromatina pode ser alterada por complexos de remodelamento da cromatina e enzimas que covalentemente modificam as proteínas histonas que formam o centro do nucleossomo (ver Figuras 5-27 e 5-28). Muitos ativadores gênicos se utilizam desses mecanismos pelo recrutamento dessas proteínas aos promotores (**Figura 8-11**). Por exemplo, muitas proteínas ativadoras da transcrição atraem as *histona-acetilases* que ligam um grupo acetila a lisinas selecionadas na cauda das proteínas histonas. Essas alterações resultantes na estrutura da cromatina provavelmente permitem uma maior acessibilidade ao DNA envolvido; além disso, o próprio grupo acetila é reconhecido por proteínas que promovem a transcrição, incluindo alguns dos fatores gerais de transcrição.

Da mesma forma, as proteínas de repressão gênica podem modificar a cromatina de maneira que reduzam a eficiência do início da transcrição. Por exemplo, muitos repressores atraem *histona-desacetilases* – enzimas que removem os grupos acetila das caudas das histonas, revertendo, dessa forma, os efeitos positivos que a acetilação tem no início da transcrição. Embora algumas proteínas repressoras eucarióticas trabalhem em uma base de gene por gene, outras podem orquestrar a formação de grandes espirais de cromatina inativa transcricionalmente contendo muitos genes. Como discutimos no Capítulo 5,

QUESTÃO 8-3

Alguns reguladores transcricionais se ligam ao DNA e induzem a dupla-hélice a dobrar-se em um ângulo agudo. Tais "proteínas torcionais" podem estimular o início da transcrição sem contatar tanto a RNA-polimerase, como qualquer um dos fatores gerais de transcrição ou qualquer outra proteína de regulação gênica. Você poderia imaginar uma explicação plausível sobre como essas proteínas poderiam trabalhar para modular a transcrição? Desenhe uma figura que ilustre a sua explicação.

Figura 8-11 Proteínas de ativação gênica eucarióticas podem direcionar alterações locais na estrutura da cromatina. Proteínas ativadoras podem recrutar enzimas que acetilam histonas ou complexos de remodelamento da cromatina para a região promotora de um gene. A ação dessas proteínas torna o DNA empacotado na cromatina mais acessível a outras proteínas na célula, incluindo aquelas necessárias para o início da transcrição. Além disso, modificações covalentes nas histonas podem servir como sítios de ligação para proteínas que estimulam a transcrição.

essas regiões de DNA resistentes à transcrição incluem a heterocromatina encontrada nos cromossomos em interfase e o cromossomo X inteiro das fêmeas de mamíferos.

OS MECANISMOS MOLECULARES QUE CRIAM TIPOS CELULARES ESPECIALIZADOS

Todas as células são capazes de ativar e desativar os genes em resposta às mudanças em seus ambientes. As células dos organismos multicelulares evoluíram essa capacidade a um grau extremo e de maneiras altamente especializadas para formar uma gama organizada de tipos celulares diferenciados. Em particular, uma vez que uma célula em um organismo multicelular se torna comprometida a diferenciar-se em um tipo celular específico, a escolha do destino é normalmente mantida por muitas gerações celulares subsequentes. Isso significa que as alterações na expressão gênica, que são frequentemente disparadas por um sinal transiente, precisam ser relembradas. Esse fenômeno de *memória celular* é um pré-requisito para a criação de tecidos organizados e para a manutenção de tipos celulares estavelmente diferenciados. Por outro lado, as mais simples mudanças na expressão gênica, tanto em eucariotos como em bactérias, são frequentemente apenas transitórias. O repressor do triptofano, por exemplo, desativa os genes do triptofano em bactérias somente na presença do triptofano. Quando o triptofano é removido do meio, os genes são novamente ativados e os descendentes da célula não possuirão a memória de que as suas ancestrais tenham sido expostas ao triptofano.

Nesta seção, discutiremos as características especiais da regulação transcricional que são encontradas nos organismos multicelulares. Nosso foco será em como esses mecanismos criam e mantêm os tipos celulares especializados que conferem a um verme, uma mosca ou um humano as suas características distintivas.

Os genes eucarióticos são regulados por combinações de proteínas

Como os reguladores transcricionais eucarióticos podem controlar a transcrição quando ligados ao DNA muitos pares de bases de distância do promotor, as sequências de nucleotídeos que controlam a expressão de um gene podem estar espalhadas por longos segmentos de DNA. Em animais e plantas, não é incomum encontrar as sequências de DNA reguladoras de um gene dispersas entre distâncias maiores de dezenas de milhares pares de nucleotídeos, embora boa parte desse DNA sirva como sequência "espaçadora" e não seja reconhecida pelos reguladores transcricionais.

Até agora, neste capítulo, tratamos os reguladores transcricionais como se cada um funcionasse individualmente para ativar ou desativar um gene. Enquanto essa ideia se mantém verdadeira para muitos ativadores e repressores bacterianos, a maioria dos reguladores transcricionais eucarióticos funciona como parte de um "comitê" de proteínas regulatórias, todas necessárias para expressar o gene na célula correta, em resposta às condições corretas, no tempo correto e na quantidade necessária.

O termo **controle combinacional** se refere à maneira como grupos de proteínas regulatórias trabalham juntos para determinar a expressão de um único gene. Vimos um exemplo simples de tal regulação por sinais múltiplos quando discutimos o óperon bacteriano *Lac* (ver Figura 8-9). Nos eucariotos, as informações regulatórias foram amplificadas, e um gene típico é controlado por dúzias de reguladores transcricionais (**Figura 8-12**). Frequentemente, algumas dessas proteínas de regulação são repressoras, e outras, ativadoras. Os mecanismos moleculares pelos quais os efeitos de todas essas proteínas são combinadas para determinar o nível final de expressão de um gene estão começando a ser entendidos somente agora. Um exemplo desse tipo de sistema regulatório

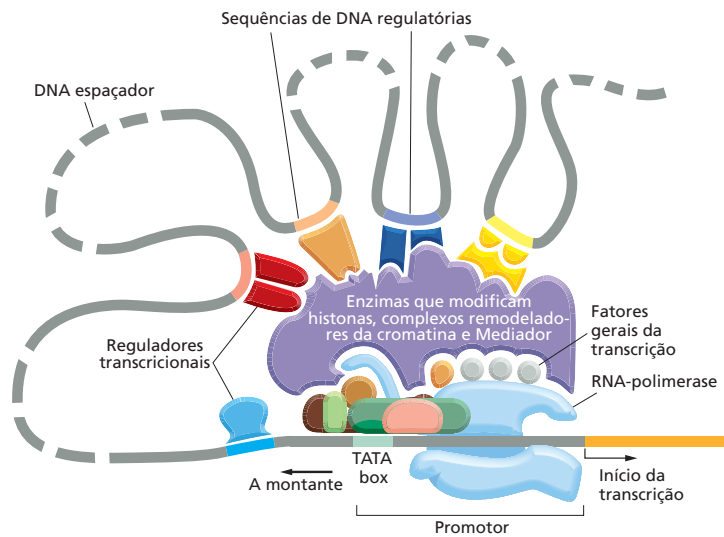



Figura 8-12 Proteínas reguladoras trabalham juntas como um "comitê" para controlar a expressão de um gene eucariótico. Enquanto os fatores gerais de transcrição que se associam ao promotor são os mesmos para todos os genes transcritos pela polimerase II, os reguladores transcricionais e as localizações dos seus sítios de ligação em relação aos promotores são diferentes para diferentes genes. Os efeitos dos múltiplos reguladores transcricionais se combinam para determinar a taxa de início da transcrição. Entretanto, ainda não está claro como esses efeitos são combinados.

complexo – que participa no desenvolvimento de uma mosca-das-frutas a partir de um ovo fertilizado – está descrito em **Como Sabemos**, p. 282-284.

A expressão de diferentes genes pode ser coordenada por uma única proteína

Tanto bactérias como eucariotos precisam ser capazes não somente de ativar e desativar genes individualmente, como também de coordenar a expressão de diferentes genes. Quando uma célula eucariótica recebe um sinal para dividir-se, por exemplo, uma quantidade de genes até agora não expressos é ativada para programar em conjunto os eventos que finalmente levam à divisão celular (discutido no Capítulo 18). Uma maneira de as bactérias coordenarem a expressão de um conjunto de genes é colocando-os juntos em um óperon sob o controle de um único promotor (ver Figura 8-6). Esse não é o caso dos eucariotos, nos quais cada gene é transcrito e regulado individualmente. Portanto, como os eucariotos coordenam a expressão gênica? Em particular, dado que uma célula eucariótica utiliza um comitê de proteínas regulatórias para controlar cada um de seus genes, como ela pode ativar ou desativar grandes grupos de genes rápida e decisivamente? A resposta é que, mesmo sendo o controle da expressão gênica combinatório, o efeito de uma única proteína de regulação gênica pode ainda ser decisivo em ativar ou desativar um determinado gene, simplesmente por completar a combinação necessária para ativar ou reprimir aquele gene. Isso seria como discar o número final de uma fechadura de combinação: a fechadura irá abrir se os outros números forem colocados previamente. Assim como o mesmo número pode completar a combinação para diferentes fechaduras, a mesma proteína pode completar a combinação para muitos genes diferentes. Se uma quantidade de genes diferentes contém sequências de DNA reconhecidas pela mesma proteína de regulação gênica, eles podem ser ativados ou desativados juntos, como uma unidade.

Um exemplo desse estilo de regulação em humanos é visto com a *proteína receptora de glicocorticoides.* Para ligar-se aos sítios regulatórios no DNA, essa proteína de regulação gênica precisa primeiro formar um complexo com a molécula de um hormônio esteroide glicocorticoide (p. ex., o cortisol; ver Tabela 16-1, p. 535). Em resposta aos hormônios glicocorticoides, as células do fígado aumentam a expressão de muitos genes diferentes, um dos quais codifica a enzima tirosina-aminotransferase, como discutido anteriormente. Esses genes são todos regulados pela ligação do complexo hormônio-receptor de glicocorticoides em um sítio regulatório no DNA de um gene. Quando o corpo estiver recuperado e o hormônio não estiver mais presente, a expressão de todos esses genes di-

COMO SABEMOS:
REGULAÇÃO GÊNICA – A HISTÓRIA DE *EVE*

A habilidade para regular a atividade de genes é crucial para o desenvolvimento apropriado de um organismo multicelular a partir de um ovo fertilizado até um adulto fértil. Iniciando nos momentos mais precoces do desenvolvimento, uma sucessão de programas controla a expressão diferencial dos genes que permitem que um animal forme um plano corporal apropriado – auxiliando a distinguir o seu dorso de seu ventre, sua cabeça de sua cauda. Esses sinais, por fim, direcionam o posicionamento correto de uma asa ou uma perna, uma boca ou um ânus, um neurônio ou uma célula sexual.

Um problema central no desenvolvimento, então, é entender como um organismo gera esses padrões de expressão gênica, os quais são estabelecidos dentro de horas após a fertilização. Uma grande parte da história se baseia na ação de reguladores transcricionais. Pela interação com diferentes sequências de DNA regulatórias, essas proteínas instruem cada célula no embrião a ativar os genes que são apropriados para aquela célula em cada período durante o desenvolvimento. Como pode uma proteína, ao ligar-se a um pedaço de DNA, auxiliar diretamente o desenvolvimento de um organismo multicelular complexo? Para ver como podemos encaminhar essa grande questão, iremos agora revisar a história de *Eve.*

No grande ovo

Even-skipped – Eve, abreviado – é um gene cuja expressão desempenha uma função importante no desenvolvimento do embrião de *Drosophila.* Se esse gene for inativado por mutação, muitas partes do embrião falham em se formar, e a larva da mosca morre precocemente em seu desenvolvimento. No estágio do desenvolvimento no qual *Eve* é primeiramente ativado, o embrião em desenvolvimento dentro do ovo é ainda uma única célula gigante contendo múltiplos núcleos imersos dentro de um citoplasma comum. Esse embrião, o qual apresenta em torno de 400 μm de comprimento e 160 μm de diâmetro, é formado a partir do ovo fertilizado por uma série de rápidas divisões nucleares que ocorrem sem divisão celular. Ao final, cada núcleo será incluído dentro de uma membrana plasmática e se tornará uma célula; entretanto, os eventos que nos interessam acontecem antes dessa celularização.

O citoplasma comum está longe de ser uniforme: a extremidade anterior (cabeça) do embrião contém proteínas diferentes daquelas da extremidade posterior (cauda). A presença dessas assimetrias no ovo fertilizado e no embrião precoce foi primeiramente demonstrada por experimentos nos quais os ovos de *Drosophila* foram induzidos a perder conteúdo. Se a extremidade frontal de um ovo for cuidadosamente perfurada e uma pequena quantidade do citoplasma anterior é exsudada, o embrião não desenvolverá os segmentos da cabeça. Além disso, se o citoplasma retirado a partir da extremidade posterior de outro ovo for então injetado dentro dessa área anterior em parte esvaziada, o animal desenvolverá um segundo conjunto de segmentos abdominais onde as partes da cabeça deveriam estar (**Figura 8-13**).

Encontrando as proteínas

Esse experimento de drenagem de ovos mostra que o padrão normal cabeça-cauda de desenvolvimento é controlado por substâncias localizadas em cada extremidade do embrião. Pesquisadores suspeitaram que essas substâncias eram proteínas. Para identificá-las, ovos foram

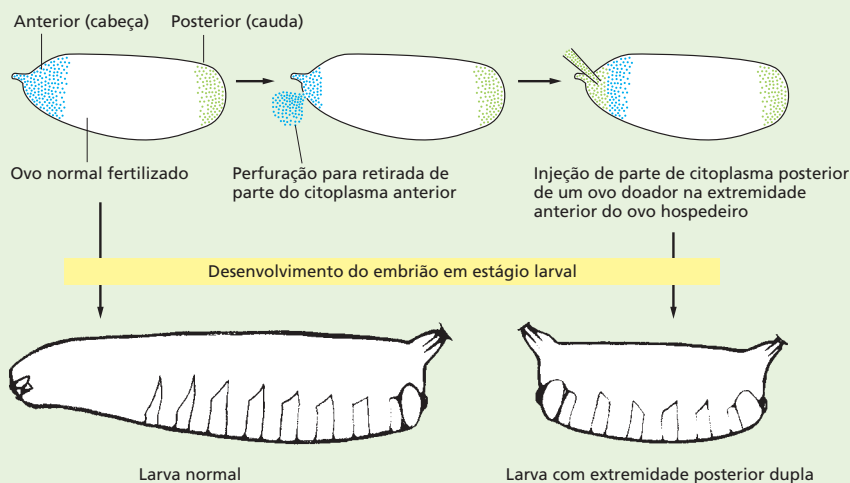



Figura 8-13 **Moléculas localizadas nas extremidades do ovo de *Drosophila* controlam a sua polaridade anteroposterior.** Uma pequena quantidade de citoplasma é deixada exsudar da extremidade anterior do ovo e é substituída por uma injeção de citoplasma posterior. O embrião resultante com duas caudas *(direita)* mostra uma duplicação dos três últimos segmentos abdominais. Um embrião normal *(esquerda)* é mostrado para comparação. (Adaptado de C. Nüsslein-Volhard, H.G. Frohnhöfer, e R. Lehmann. *Science* 238:1675-1681, 1987. Com permissão de AAAS.)

sujeitos a um tratamento que inativaria genes aleatoriamente. Eles então procuraram por embriões cujo padrão cabeça-cauda do corpo parecia anormal. Nesses animais mutantes, os genes que foram inativados devereriam codificar proteínas importantes para a determinação da polaridade anteroposterior.

Usando esse procedimento, pesquisadores descobriram muitos genes usados para o estabelecimento da polaridade anteroposterior, incluindo genes que codificam quatro proteínas-chave na regulação da transcrição: Bicoid, Hunchback, Krüppel e Giant. (Os genes de *Drosophila* são frequentemente denominados por nomes pitorescos ou esdrúxulos que refletem a aparência das moscas nas quais o gene é inativado por mutação.) Uma vez que essas proteínas fossem identificadas, os pesquisadores poderiam preparar anticorpos que as reconhecessem. Esses anticorpos, acoplados a marcadores fluorescentes, foram então usados para determinar onde, no embrião precoce, cada proteína estava localizada (ver Painel 1-1, p. 8-9).

Os resultados desses experimentos de marcação por anticorpos são bastante surpreendentes. O citoplasma do embrião precoce, como ele se apresenta, contém uma mistura desses reguladores transcricionais, cada uma distribuída desigualmente ao longo do comprimento do embrião (**Figura 8-14**). Como resultado, os núcleos dessa célula gigante e multinucleada começam a expressar genes diferentes dependendo de quais reguladores transcricionais eles encontram, as quais, por sua vez, dependem da sua localização no embrião. Os núcleos próximos da extremidade anterior do embrião, por exemplo, estão expostos a um conjunto de reguladores transcricionais que é distinto do conjunto que influencia os núcleos da extremidade posterior. Assim, as diferentes quantidades dessas proteínas fornecem aos núcleos do embrião em desenvolvimento informações posicionais que os permitem determinar onde eles estão localizados ao longo do eixo anteroposterior do embrião.

Aqui é onde *Eve* entra. As sequências de DNA regulatórias do gene *Eve* podem reconhecer as concentrações dos reguladores transcricionais em cada posição ao longo do comprimento do embrião. Com base nessa informação, o gene *Eve* é expresso em sete faixas, cada uma precisamente posicionada ao longo do eixo anteroposterior do embrião. Para descobrir como essas proteínas regulatórias controlam a expressão de *Eve* com tanta precisão, os pesquisadores a seguir voltaram o foco para a região regulatória do gene *Eve.*

Dissecando o *DNA*

Como veremos neste capítulo, as sequências regulatórias de DNA controlam quais células em um organismo irão expressar um gene particular e em que ponto aquele gene será desativado. Uma maneira para aprender quando e onde uma sequência de DNA regulatória está ativa é conectar a sequência em um **gene repórter** – um gene codificando uma proteína cuja atividade é bem fácil de monitorar experimentalmente. As sequências regulatórias irão agora direcionar a expressão do gene repórter. Essa construção artificial de DNA é então recolocada em uma célula ou em um organismo, e a atividade da proteína repórter é mensurada.

Pelo acoplamento de várias porções da sequência regulatória de *Eve* a um gene repórter, os pesquisadores descobriram que o gene *Eve* contém uma série de sete módulos regulatórios, cada um dos quais é responsável por especificar uma única faixa de expressão de *Eve* ao longo do embrião. Dessa forma, por exemplo, os pesquisadores poderiam remover o módulo regulatório que especifica a faixa 2 da sua posição normal acima de *Eve,* colocá-lo à frente de um gene repórter e recolocar essa sequência de DNA manipulada dentro do genoma de *Drosophila* (**Figura 8-15A**). Quando os embriões carregando essa construção genética foram examinados, o gene repórter foi encontrado expresso precisamente na posição da faixa 2 (Figura 8-15B). Experimentos semelhantes revelaram a existência de outros módulos regulatórios, um para cada uma das outras seis faixas.

A questão então é: como cada um desses módulos direciona a formação de uma única faixa em uma posição específica? A resposta, encontraram os pesquisadores, é a de que cada módulo contém uma combinação única de sequências regulatórias que se ligam em diferentes combinações aos quatro reguladores transcricionais, os

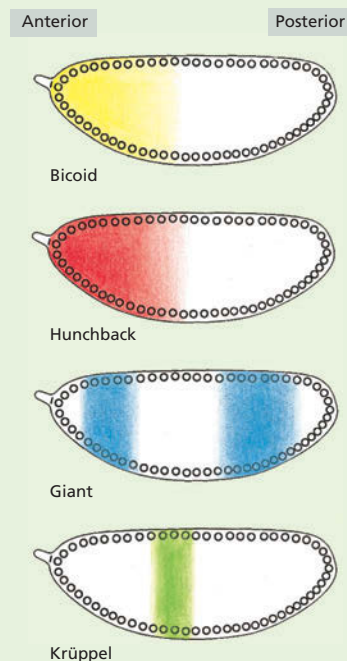



Figura 8-14 O embrião precoce de *Drosophila* mostra uma distribuição não uniforme de quatro reguladores transcricionais.

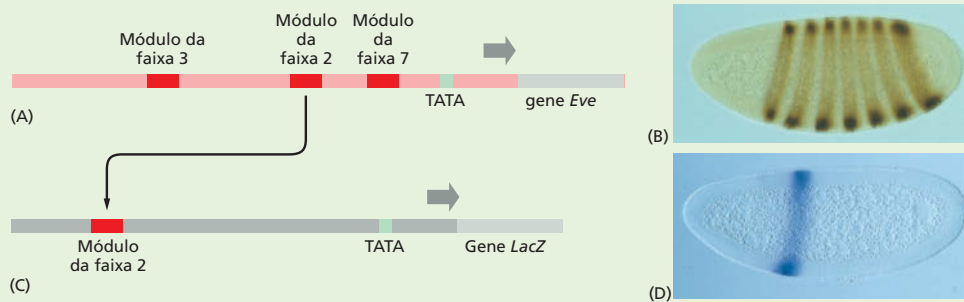



Figura 8-15 **Um gene repórter mostra a construção modular da região regulatória do gene *Eve*.** (A) O gene *Eve* contém sequências regulatórias que dirigem a produção da proteína Eve em faixas ao longo do embrião. (B) Os embriões marcados com anticorpos para a proteína Eve mostram as sete faixas características de Eve. (C) Nesse experimento, um pedaço de 480 nucleotídeos da região regulatória de *Eve* (módulo da faixa 2 de A) foi removido e inserido acima do gene de *E. coli LacZ*, o qual codifica a enzima β-galactosidase (ver Figura 8-9). (D) Quando essa construção de DNA manipulado contendo uma única região regulatória é reintroduzida no genoma de um embrião de *Drosophila*, o embrião resultante expressa a β-galactosidase precisamente na posição da segunda das sete faixas de *Eve*. A atividade enzimática é ensaiada pela adição de X-gal, um açúcar modificado que, quando clivado pela β-galactosidase, gera um produto azul insolúvel. (B) (B e D, cortesia de Stephen Small e Michael Levine.)

quais estão presentes em gradientes no embrião precoce. A unidade da faixa 2, por exemplo, contém sequências de reconhecimento para todas os quatro reguladores transcricionais – dois ativam a transcrição de *Eve,* Bicoid e Hunchback, e Krüppel e Giant a reprimem (**Figura 8-16**). As concentrações dessas quatro proteínas variam ao longo do embrião (ver Figura 8-14), e esses padrões determinam quais dessas proteínas estão ligadas ao módulo de Eve em cada posição ao longo do embrião. A combinação de proteínas ligadas então "ordena" ao núcleo a expressão apropriada de *Eve*, e a faixa 2 é formada.

Acredita-se que os outros módulos regulatórios de faixas estejam construídos ao longo de linhas semelhantes; cada módulo sendo desenhado para detectar informações posicionais fornecidas por alguma combinação única de reguladores transcricionais e a expressão de *Eve* como base dessa informação. Toda a região controladora gênica de *Eve* está enfileirada por mais de 20.000 pares de nucleotídeos de DNA e se liga a mais de 20 proteínas diferentes, incluindo as quatro que discutimos. Uma grande e complexa região controladora é assim construída a partir de uma série de módulos menores, cada um dos quais consiste em um arranjo único de pequenas sequencias de DNA reconhecidas por reguladores transcricionais específicos. Dessa maneira, um único gene pode responder a um enorme número de informações combinatórias. O próprio *Eve* é uma proteína de regulação gênica e – em combinação com muitas outras proteínas regulatórias – controla eventos-chave mais tardiamente no desenvolvimento da mosca. Essa organização começa a explicar como o desenvolvimento de um organismo complexo pode ser orquestrado por aplicações repetidas de alguns poucos princípios básicos.

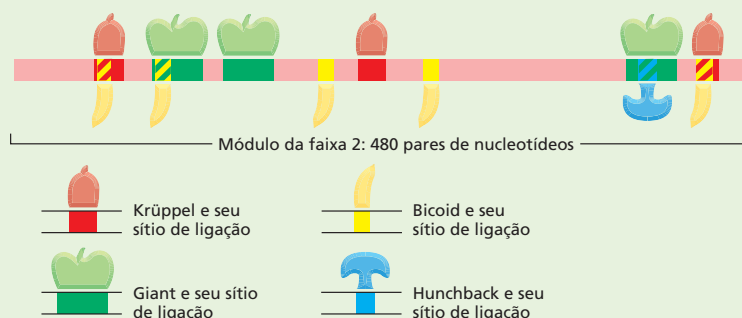



Figura 8-16 **O módulo regulatório para a faixa 2 de *Eve* contém os sítios de ligação para quatro reguladores transcricionais diferentes.** Todos os quatro reguladores transcricionais são responsáveis pela expressão apropriada de *Eve* na faixa 2. As moscas que são deficientes em dois ativadores, Bicoid e Hunchback, não formam a faixa 2 eficientemente; nas moscas deficientes, em qualquer dos dois repressores, Giant ou Krüppel, a faixa 2 se expande e cobre uma região anormalmente ampla do embrião. Como indicado na parte de cima do diagrama, em alguns casos, os sítios de ligação para os reguladores transcricionais se sobrepõem e as proteínas podem competir pela ligação ao DNA. Por exemplo, acredita-se que as ligações de Bicoid e Krüppel ao sítio mais à direita sejam mutuamente exclusivas.

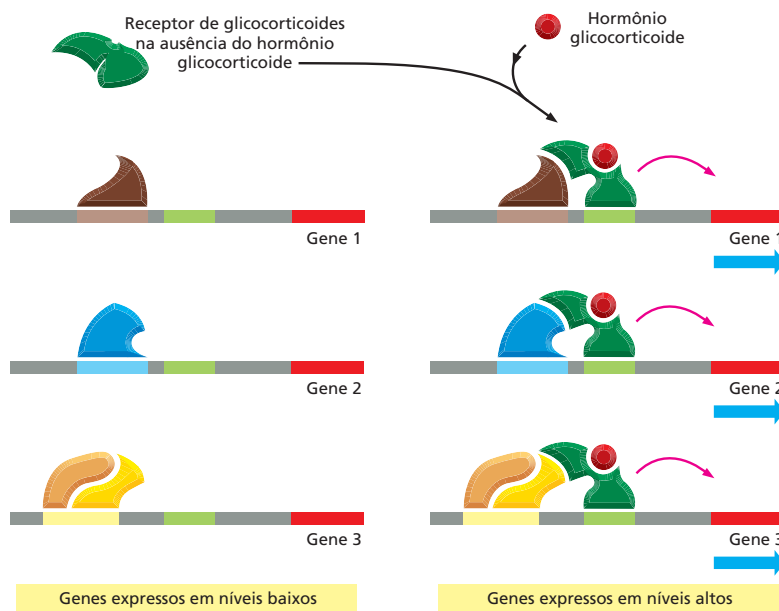



Figura 8-17 Uma única proteína de regulação gênica pode coordenar a expressão de muitos genes diferentes. É ilustrada a ação do receptor de glicocorticoides. À esquerda, é indicada uma série de genes, cada qual possui várias proteínas de ativação gênica ligadas à sua região regulatória. Entretanto, essas proteínas ligadas não são suficientes para sozinhas ativarem eficientemente a transcrição. À direita, é indicado o efeito de colocar uma proteína de regulação gênica adicional – o receptor de glicocorticoides em um complexo com o hormônio glicocorticoide – que pode ligar-se à região regulatória de cada gene. O receptor de glicocorticoides completa a combinação de reguladores transcricionais necessária para uma iniciação eficiente da transcrição, e os genes são agora ativados como um conjunto.

minui para o seu nível normal. Dessa maneira, uma única proteína de regulação gênica pode controlar a expressão de muitos genes diferentes (**Figura 8-17**).

O controle combinatório pode criar diferentes tipos celulares

A habilidade para ativar ou desativar muitos genes diferentes usando somente uma proteína não é somente útil na regulação dia a dia da função celular. Ela é também um dos meios pelos quais as células eucarióticas se diferenciam em tipos particulares de células durante o desenvolvimento embrionário.

Um exemplo surpreendente do efeito de uma única proteína de regulação gênica na diferenciação vem do estudo do desenvolvimento das células musculares. Uma célula muscular esquelética de mamíferos é um tipo celular altamente característico. Ela é, em geral, uma célula extremamente grande que é formada pela fusão de muitas células musculares precursoras chamadas de *mioblastos*. A célula muscular madura se distingue das outras células pela produção de um grande número de proteínas características, como actina e miosina, que fazem parte do aparato contrátil (discutido no Capítulo 17), assim como proteínas receptoras e proteínas de canais iônicos das membranas celulares que tornam a célula muscular sensível à estimulação nervosa. Os genes que codificam essas proteínas musculares específicas são todos ativados coordenadamente assim que os mioblastos começam a fundir-se. Estudos de células musculares diferenciando-se em cultura têm identificado proteínas-chave de regulação gênica, expressas somente em células musculares potenciais, que coordenam a expressão gênica e, dessa forma, são cruciais para a diferenciação das células musculares. Esses reguladores ativam a transcrição dos genes que codificam proteínas musculares específicas pela ligação a sítios presentes em suas regiões regulatórias.

Essas proteínas-chave de regulação gênica podem converter células não musculares em mioblastos pela ativação de mudanças na expressão gênica típicas de células musculares em diferenciação. Por exemplo, quando um desses reguladores, MyoD, é introduzido nos fibroblastos em cultura a partir de tecido conectivo, os fibroblastos começam a se comportar como mioblastos e se fusionam para formar células semelhantes a musculares. O efeito de expressar o gene *MyoD* nos fibroblastos é mostrado na **Figura 8-18**. Parece que os fibroblastos, os quais são derivados da mesma ampla classe de células embrionárias das células

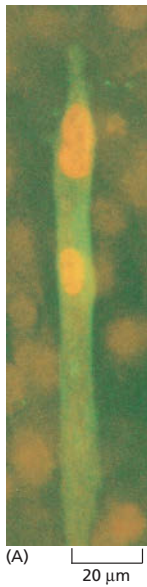
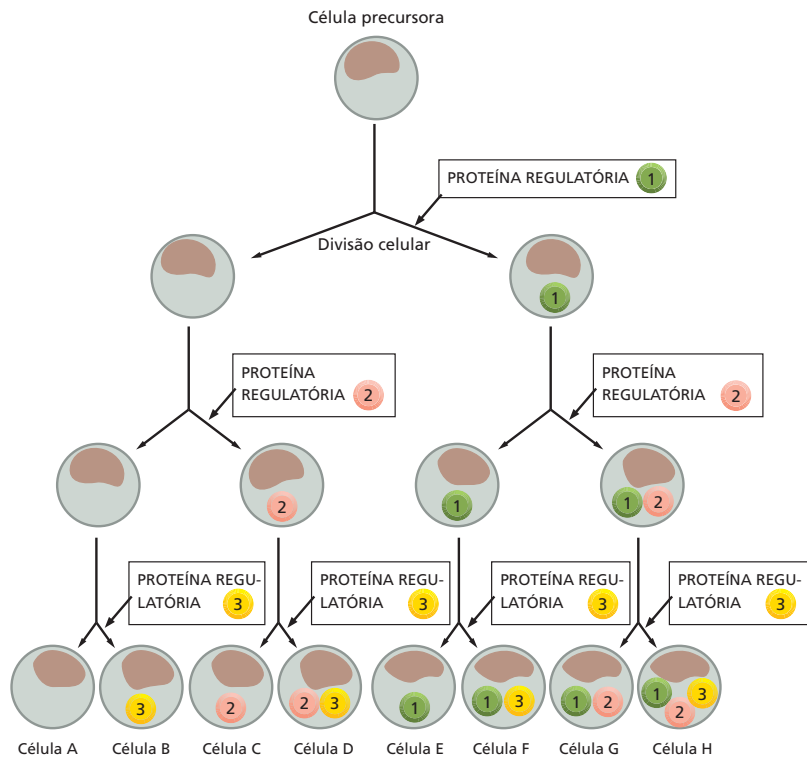



Figura 8-18 Fibroblastos podem ser convertidos em células musculares por uma única proteína de regulação gênica. Como mostrado nessa micrografia imunofluorescente, os fibroblastos da pele de um embrião de galinha foram convertidos em células musculares pela expressão induzida experimentalmente do gene *MyoD*. Os fibroblastos que expressam o gene *MyoD* se fusionaram para formar células multinucleadas alongadas semelhantes às musculares, as quais estão coradas em *verde* com um anticorpo que detecta uma proteína específica de músculo. Os fibroblastos que não expressam o gene *MyoD* estão fracamente visíveis ao fundo. (Cortesia de Stephen Tapscott e Harold Weintraub.)

musculares, já haviam acumulado todos os outros reguladores transcricionais necessários para o controle combinatório dos genes musculares específicos, e que a adição de MyoD completa a combinação específica que direciona as células a tornarem-se musculares. Alguns outros tipos celulares não se convertem em músculo pela adição de MyoD; essas células presumivelmente não acumularam os outros reguladores transcricionais necessários durante a sua história de desenvolvimento.

Como o acúmulo dos diferentes reguladores transcricionais pode levar à geração de diferentes tipos celulares está ilustrado esquematicamente na **Figura 8-19**. Essa figura também ilustra como, graças às possibilidades de controle combinatório e sequências regulatórias compartilhadas, um conjunto limitado de reguladores transcricionais pode controlar a expressão de um número muito maior de genes.

A conversão de um tipo celular (fibroblasto) a outro (músculo) por uma simples proteína de regulação gênica enfatiza um dos mais importantes princípios discutidos neste capítulo: as grandes diferenças entre os tipos celulares – como tamanho, forma e função – são produzidas por diferenças na expressão gênica.

Figura 8-19 Combinações de poucos reguladores transcricionais podem gerar muitos tipos celulares durante o desenvolvimento. Neste esquema simples, uma "decisão" para fazer uma nova proteína de regulação gênica (mostrada como *círculos numerados)* é tomada após cada ciclo de divisão celular. A repetição dessa regra simples possibilita oito tipos celulares (A até H) a serem criados usando somente três reguladores transcricionais diferentes. Cada um desses tipos celulares hipotéticos iriam então expressar genes diferentes, como indicado pela combinação dos reguladores transcricionais que estão presentes dentro delas.

Padrões estáveis de expressão gênica podem ser transmitidos para células-filhas

Como discutido anteriormente, neste capítulo, uma vez que uma célula em um organismo multicelular se tenha diferenciado em um tipo celular particular, ela normalmente se mantém diferenciada, e todas as células da progênie serão do mesmo tipo celular. Algumas células altamente especializadas, uma vez diferenciadas, nunca mais se dividem; por exemplo, as células musculares esqueléticas e os neurônios. Contudo, muitas outras células diferenciadas, como fibroblastos, células musculares lisas e células do fígado (hepatócitos), irão dividir-se muitas vezes na vida de um indivíduo. Todos esses tipos de células somente originam células semelhantes a elas quando se dividem: células musculares lisas não originam células do fígado, nem células do fígado originam fibroblastos.

Essa preservação da identidade celular significa que mudanças na expressão gênica que originam uma célula diferenciada precisam ser relembradas e passadas para as suas células-filhas através de todas as divisões celulares subsequentes. Por exemplo, nas células ilustradas na Figura 8-19, a produção de cada proteína de regulação gênica, uma vez iniciada, tem de ser perpetuada nas células-filhas de cada divisão celular. Como isso poderia ser feito?

As células possuem várias maneiras de garantir que as células-filhas "relembrem" que tipo de células elas supostamente são. Uma das mais simples é por meio de um **circuito de retroalimentação positiva**, no qual uma proteína-chave de regulação gênica ativa a transcrição do seu próprio gene adicionalmente a outros genes celulares específicos (**Figura 8-20**). A proteína de regulação gênica MyoD discutida anteriormente funciona nesse tipo de circuito de retroalimentação positiva. Outra maneira de manter o tipo celular é pela propagação fiel das estruturas da cromatina a partir das células parentais para as filhas. Vimos um exemplo disso na Figura 5-30, onde o mesmo cromossomo X é inativado por muitas gerações celulares.

Uma terceira maneira pela qual as células podem transmitir informação sobre a expressão de genes para a sua progênie é por meio da **metilação de DNA**. Em células de vertebrados, a metilação de DNA ocorre exclusivamente na base citosina (**Figura 8-21**). Essa modificação covalente de citosinas normalmente desliga genes pela atração de proteínas que bloqueiam a expressão gênica. Os padrões de metilação de DNA são passados para as células da progênie pela ação de uma enzima que copia o padrão de metilação da fita de DNA parental para a fita de DNA filha, imediatamente após a replicação (**Figura 8-22**). Esses mecanismos – ciclos de retroalimentação positiva, certas formas de cromatina con-

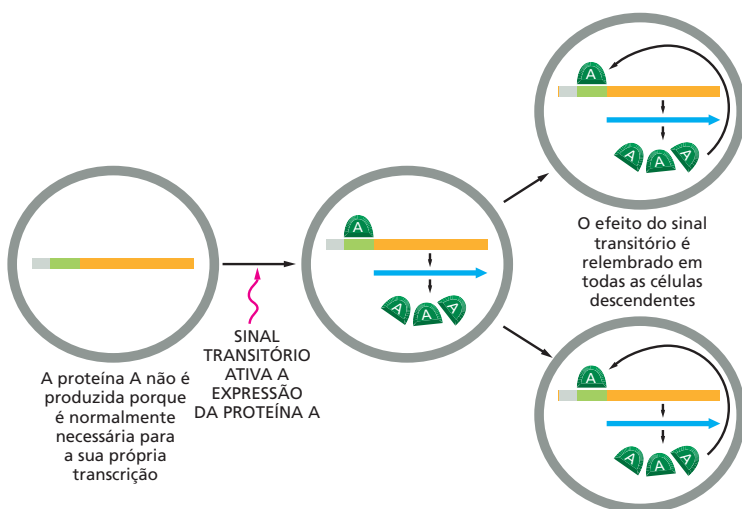



Figura 8-20 Um circuito de retroalimentação positiva pode criar a memória celular. A proteína A é uma proteína de regulação gênica que ativa a sua própria transcrição. Todos os descendentes da célula original irão, dessa maneira, "relembrar-se" de que a célula progenitora experimentou um sinal transitório que iniciou a produção da proteína.

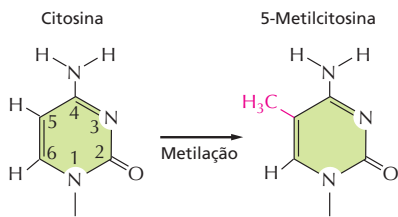



Figura 8-21 A formação de 5-metilcitosina ocorre por metilação da base citosina na hélice de DNA de fita dupla. Em vertebrados, esse evento é confinado a nucleotídeos citosina (C) selecionados que são seguidos de uma guanina (G).

densada e metilação de DNA – transmitem informação da célula parental para a filha sem alterar a sequência real de nucleotídeos do DNA, sendo considerados formas de *herança epigenética* (ver p.192).

A formação de um órgão inteiro pode ser desencadeada por uma única proteína de regulação gênica

Vimos que mesmo que o controle combinatório seja a norma para os genes eucarióticos, uma única proteína de regulação gênica pode ser decisiva em ativar ou desativar um conjunto inteiro de genes, e vimos como isso pode converter um tipo celular em outro. Uma extensão dramática desse princípio vem dos estudos sobre o desenvolvimento do olho em *Drosophila,* camundongos e humanos. Aqui, uma única proteína de regulação gênica, chamada de Ey em moscas e Pax-6 em vertebrados, é crucial para o desenvolvimento do olho. Quando expressa no tipo apropriado de célula, Ey pode desencadear a formação de não somente um único tipo de célula, mas de um órgão inteiro – o olho – composto de diferentes tipos de células, todas apropriadamente organizadas no espaço tridimensional.

A melhor evidência para a ação de Ey vem do experimento em moscas-das-frutas, no qual o gene *Ey* é artificialmente expresso de forma precoce no desenvolvimento em células que normalmente irão formar as pernas. Essa expressão gênica anormal induz o desenvolvimento de olhos no meio das pernas (**Figura 8-23**). O olho de *Drosophila* é composto de milhares de células, e, como a proteína Ey coordena a especificação de cada célula no olho, é um tópico ativamente estudado na biologia do desenvolvimento. Aqui notamos que Ey controla diretamente a expressão de muitos genes pela ligação às suas regiões regulatórias. Alguns dos genes controlados por Ey codificam reguladores transcricionais adicionais que, por sua vez, controlam a expressão de outros genes. Entretanto, alguns desses reguladores transcricionais agem no próprio *Ey* para criar um circuito de retroalimentação positiva que assegura a continuidade da produção da proteína Ey. Então, a ação de uma proteína regulatória pode produzir uma cascata de reguladores cujas ações combinadas levam à formação de um grupo organizado de muitos diferentes tipos de células. Pode-se começar a imaginar agora, pela aplicação repetida desse princípio, um organismo complexo sendo construído pedaço por pedaço.

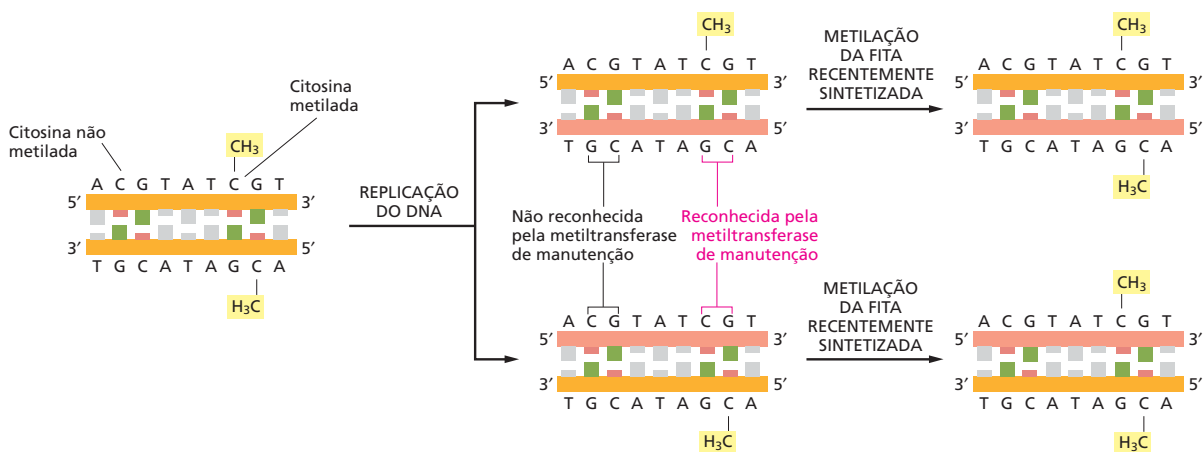



Figura 8-22 Os padrões de metilação de DNA podem ser herdados fielmente. Uma enzima denominada metiltransferase de manutenção garante que uma vez que um padrão de metilação de DNA tenha sido estabelecido, ele é herdado pelo DNA da progênie. Imediatamente após a replicação, cada hélice-filha irá conter uma fita de DNA metilada – herdada da hélice parental – e uma não metilada, fita sintetizada nova. A metiltransferase de manutenção interage com essas hélices híbridas, onde metila apenas aquelas sequências CG que estão pareadas com uma sequência CG já metilada. Em DNA de vertebrados, uma grande fração de citosinas em sequências CG são metiladas.

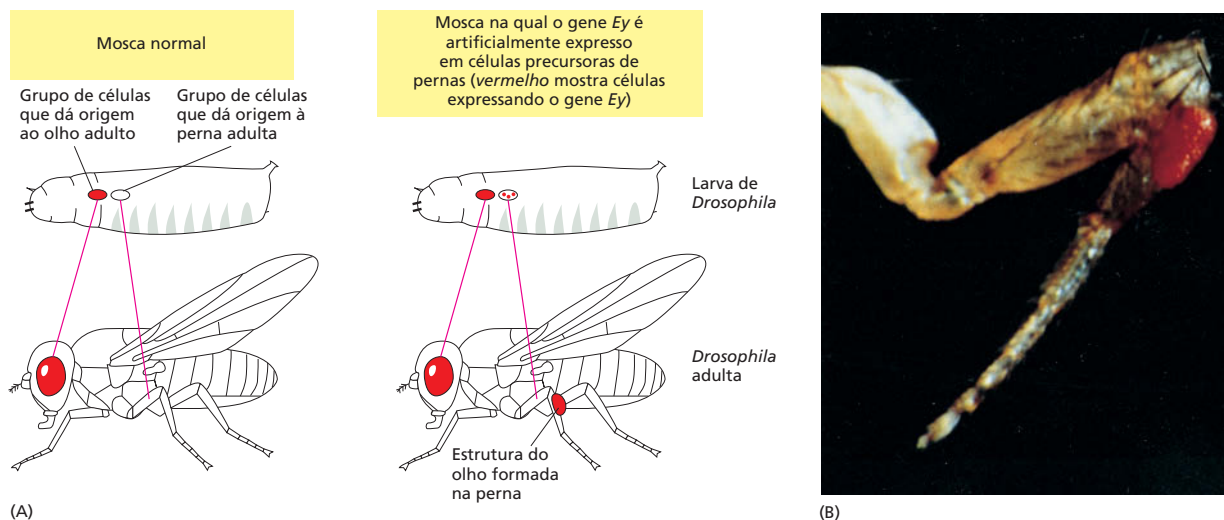



Figura 8-23 A expressão do gene *Ey* de *Drosophila* em células precursoras de pernas induz o desenvolvimento de olhos nas pernas. (A) Diagramas simplificados mostrando o resultado quando a larva da mosca-das-frutas contém tanto a expressão normal do gene *Ey* (*esquerda*) ou o gene *Ey* que é adicionalmente expresso artificialmente em células que darão origem a pernas (*direita*). (B) Fotografia de uma perna anormal que contém um olho fora de seu lugar. (B, cortesia de Walter Gehring.)

CONTROLES PÓS-TRANSCRICIONAIS

Vimos que os reguladores transcricionais controlam a expressão gênica ativando ou inativando o início da transcrição. A grande maioria dos genes em todos os organismos é regulada dessa maneira. No entanto, pontos adicionais de controle podem vir após o caminho do DNA até à proteína, dando à célula mais uma oportunidade de controlar a quantidade do produto do gene que está sendo feita. Esses **controles pós-transcricionais**, que operam depois da RNA-polimerase que se ligam a promotores de genes e iniciam a síntese de RNA, são cruciais para a regulação de muitos genes.

No Capítulo 7, descrevemos um tipo de controle pós-transcricional: o *splicing* alternativo, que permite que diferentes formas de uma mesma proteína sejam produzidas em diferentes tecidos (Figura 7-21). Aqui, discutiremos alguns outros exemplos das muitas maneiras pelas quais as células podem manipular a expressão gênica após a transcrição ter sido iniciada.

Riboswitches fornecem uma solução econômica para a regulação gênica

Dos mecanismos para o controle da expressão gênica que temos descrito até agora, todos envolvem a participação de uma proteína reguladora. Entretanto, cientistas têm recentemente descoberto um número de mRNA que pode regular sua própria transcrição e tradução. Esses mRNAs autorreguladores contêm **riboswitches** – pequenas sequências de RNA que modificam sua conformação quando ligadas a pequenas moléculas, como metabólitos. Muitos *riboswitches* têm sido descobertos, e cada um reconhece uma pequena molécula específica. A modificação conformacional que é dirigida pela ligação de tal molécula pode regular a expressão gênica (**Figura 8-24**). Essa maneira de regulação gênica é particularmente comum em bactérias, onde os *riboswitches* são sensíveis a pequenos metabólitos na célula e consequentemente ajustam a sua expressão gênica.

Riboswitches são talvez o exemplo mais econômico de controle gênico, porque eles contornam a necessidade de proteínas regulatórias no total. O fato de que pequenas sequências de RNA possam formar tais artifícios altamente eficientes de controle gênico oferece mais evidências de que, antes de células mo-

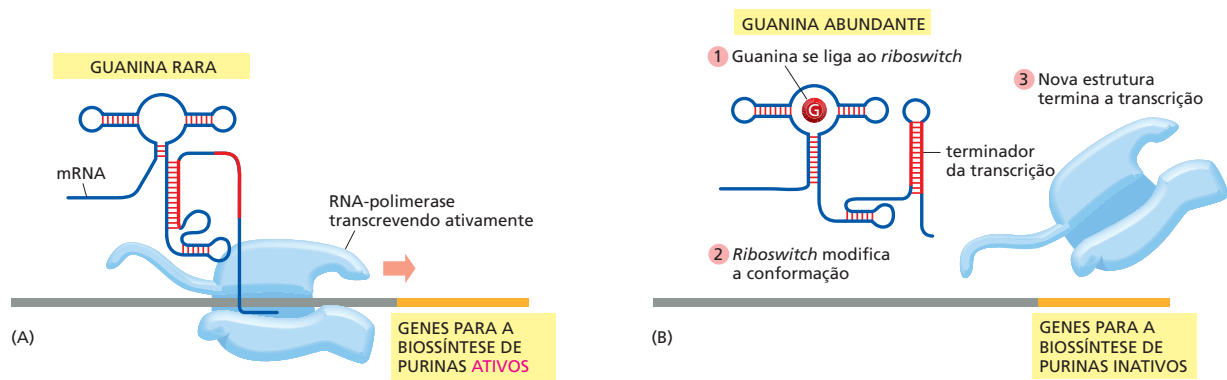



Figura 8-24 **Um *riboswitch* controla os genes da biossíntese de purinas em bactérias.** (A) Quando os níveis de guanina são baixos, o *riboswitch* adota uma estrutura que permite que a RNA-polimerase que já tenha iniciado a transcrição continue a transcrever os genes da biossíntese de purinas. As enzimas necessárias para a síntese de guanina são então expressas. (B) Quando a guanina está abundante, ela se liga ao *riboswitch*, provocando uma modificação conformacional. A nova conformação inclui uma estrutura fita dupla (em *vermelho*) que força a polimerase a terminar a transcrição antes que ela chegue nos genes biossintéticos de purinas. Na ausência de purinas, a formação dessa estrutura de fita dupla é bloqueada porque uma das fitas de RNA que forma essa estrutura fita dupla pareia com uma região diferente do *riboswitch* (A). Nesse exemplo, o *riboswitch* bloqueia o término de um mRNA. Outros *riboswitches* controlam a tradução de moléculas de mRNA uma vez que tenham sido sintetizadas. (Adaptada de M.Mandal e R.R. Breaker, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:451-63, 2004. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

dernas surgirem, um mundo governado por RNAs pode ter atingido um alto nível de sofisticação (ver p. 261-264).

Regiões não traduzidas de mRNAs podem controlar sua tradução

Uma vez que um mRNA tenha sido sintetizado, uma das maneiras mais comuns de regulação de quanto de seu produto de proteína é feito é o controle do início da tradução. Embora os detalhes do início da tradução sejam diferenciados entre eucariotos e bactérias, ambos usam a mesma estratégia básica para regular a expressão gênica nessa etapa.

Os mRNAs bacterianos contêm uma pequena sequência para ligação do ribossomo, localizada poucos nucleotídeos a montante do códon AUG onde a tradução inicia. Essa sequência de reconhecimento forma pares de base com o RNA na subunidade pequena ribossomal, posicionando corretamente o códon AUG de início da tradução dentro do ribossomo. Visto que essa interação é necessária para um início da tradução eficiente, ela se torna um alvo ideal para o controle da tradução. Bloqueando – ou expondo – a sequência de reconhecimento do ribossomo, a bactéria pode tanto inibir – ou promover – a tradução de um mRNA (**Figura 8-25**).

Os mRNAs eucarióticos possuem uma extremidade 5′ que auxilia a direcionar o ribossomo para o primeiro AUG, o códon onde a tradução irá iniciar (ver Figura 7-35). Em células eucarióticas, repressores podem inibir o início da tradução pela sua ligação a sequências de RNA específicas na região 5′ não traduzida do mRNA, impedindo que o ribossomo encontre o primeiro AUG. Quando as condições se modificam, a célula pode inativar o repressor e então aumentar a tradução do mRNA.

RNAs regulatórios pequenos controlam a expressão de milhares de genes de animais e de plantas

Como visto no Capítulo7, RNAs executam muitos papéis importantes na célula. Além de agirem como carregadores intermediários da informação genética, eles desempenham um papel-chave nas vias catalítica e estrutural, particularmente na síntese de proteínas (ver p. 253-254). Todavia, uma série recente de descobertas surpreendentes têm revelado que RNAs não codificantes – aqueles que não produzem diretamente uma proteína – são muito mais prevalentes do que previamente imaginado e desempenham um papel imprevisto e abrangente na regulação da expressão gênica.

Um tipo particularmente importante de RNA não codificante, encontrado em plantas e animais, é chamado de **microRNA** (**miRNA**). Humanos, por exemplo, produzem mais de 400 diferentes miRNAs, que parecem regular ao menos um terço de todos os genes que codificam proteínas. Esses RNAs regulatórios

pequenos controlam a expressão de genes por pareamento de bases com mRNAs específicos, além de sua estabilidade e tradução.

Como outros RNAs não codificantes, tRNA e rRNA, o transcrito do precursor de miRNA sofre um tipo especial de processamento para produzir o miRNA maduro. Esse miRNA se associa então com proteínas especializadas para formar um *complexo silenciador induzido por RNA* (*RISC*). O RISC patrulha o citoplasma procurando por mRNAs que sejam complementares ao miRNA que carregam (**Figura 8-26**). Uma vez que o mRNA pareia com o miRNA, ele é destruído imediatamente por uma nuclease presente dentro do RISC, ou sua tradução é bloqueada, ou ele é levado a uma região do citoplasma onde outras nucleases finalmente o degradarão. Uma vez que o RISC tenha cuidado da molécula de mRNA, ela é liberada e está livre para procurar moléculas de mRNA adicionais. Então, um único miRNA – como parte do RISC – pode eliminar uma molécula de mRNA e depois outra, bloqueando eficientemente a produção da proteína codificada pelo mRNA.

Duas características dos miRNAs os tornam reguladores da expressão gênica especialmente úteis. Primeiro, um único miRNA pode regular um conjunto inteiro de diferentes mRNAs, e os mRNAs carregam uma sequência comum; essas sequências estão frequentemente localizadas nas suas regiões 5′ e 3′ não traduzidas. Em humanos, alguns miRNAs individuais controlam centenas de diferentes mRNAs dessa maneira. Segundo, um gene que codifica um miRNA ocupa relativamente pouco espaço no genoma comparado com um gene que codifica uma proteína reguladora transcricional. Além disso, seu pequeno tamanho é uma das razões porque miRNAs foram descobertos apenas recentemente. Embora se esteja apenas começando a entender o impacto total dos miRNAs, está claro que eles representam uma parte importante do equipamento celular para a regulação da expressão de seus genes.

A interferência do RNA destrói RNAs de fita dupla estranhos

Algumas das proteínas que processam e empacotam miRNAs também servem como um mecanismo de defesa para a célula: elas orquestram a destruição de moléculas de RNA "estranhos", especificamente aquelas que são de fita dupla. Muitos vírus – e elementos genéticos transponíveis – produzem RNA de fita du-

Figura 8-25 A expressão de genes pode ser controlada pela regulação do início da tradução. (A) Sequências específicas de proteínas que se ligam a RNA podem reprimir a tradução de mRNAs específicos, impedindo o ribossomo de ligar-se à sequência de reconhecimento do ribossomo (*laranja*) encontrado no início do gene que codifica a proteína bacteriana. Algumas proteínas ribossomais usam esse mecanismo para inibir a tradução de seu próprio mRNA. (B) Um mRNA do patógeno *Listeria monocytogenes* contém uma sequência de RNA "termossensora" que controla a tradução de um conjunto de genes de virulência. Em temperatura quente, que a bactéria encontra dentro do hospedeiro humano, a sequência termossensora é desnaturada, e os genes da virulência são expressos. (C) A ligação de pequenas moléculas ao *riboswitch* provoca um rearranjo estrutural do RNA, sequestrando a sequência de reconhecimento do ribossomo e bloqueando o início da tradução. (D) Um RNA "antissenso" complementar, produzido por outro gene, pareia-se com um mRNA específico e bloqueia sua tradução. Embora esses exemplos de controle da tradução sejam de bactérias, muitos dos mesmos princípios operam em eucariotos.

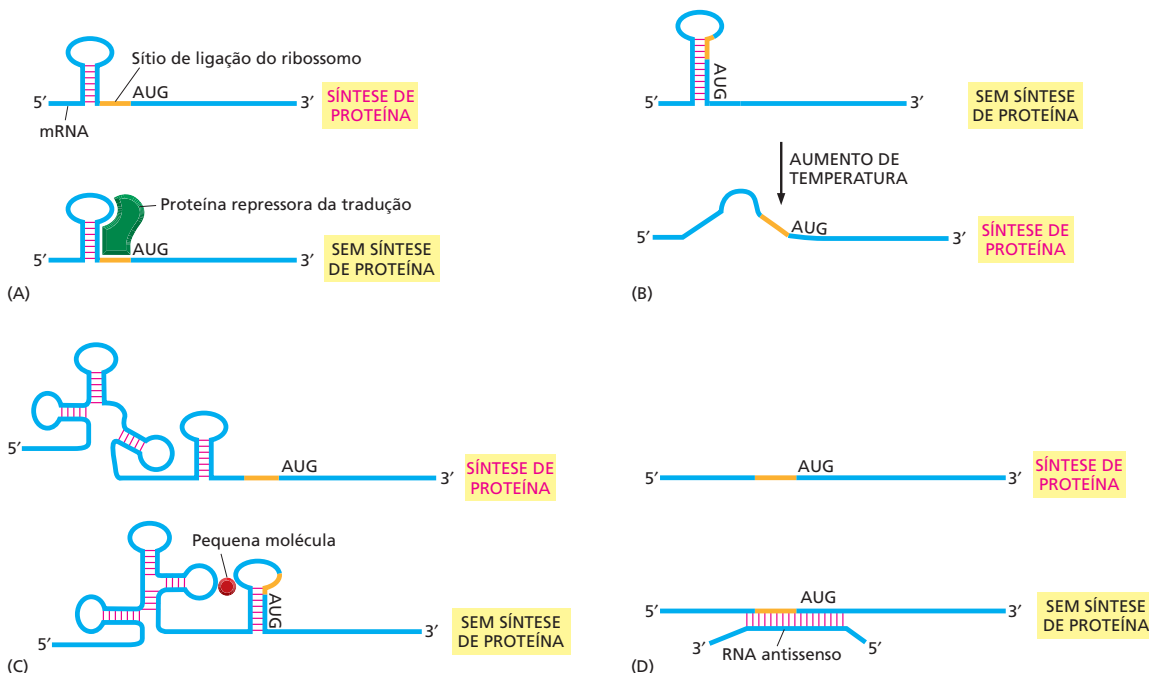
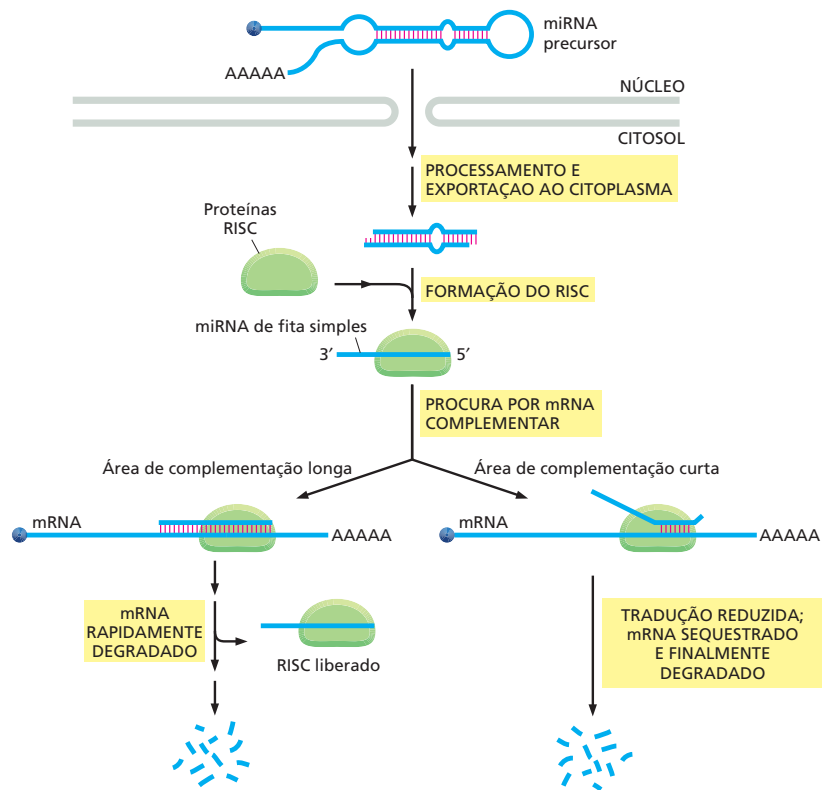



Figura 8-26 **Um miRNA marca um mRNA transcrito complementar para destruição.** O miRNA precursor é processado para formar um miRNA maduro. Ele então se associa a um conjunto de proteínas em um complexo denominado RISC. O miRNA guia o complexo RISC aos mRNAs que possuem uma sequência nucleotídica complementar. Dependendo de quão longa a região complementar é, o mRNA-alvo é rapidamente degradado por uma nuclease dentro do RISC ou transferido para uma área do citoplasma onde outras nucleases celulares o destruirão.

pla algumas vezes nos seus ciclos de vida. Esse mecanismo de degradação do RNA marcado, chamado de **interferência do RNA (RNAi)**, auxilia a manter o controle desses invasores potencialmente perigosos.

A presença de RNA de fita dupla estranho na célula estimula o RNAi a atrair um complexo proteico contendo uma nuclease denominada Dicer. Dicer cliva o RNA de fita dupla em pequenos fragmentos (aproximadamente 23 nucleotídeos de comprimento) chamados de **pequenos RNAs de interferência** (**siRNAs**, de *small interfering RNAs*). Esses pequenos RNAs de fita dupla são então incorporados a complexos RISC, os mesmos complexos que podem carregar miRNAs. O complexo RISC descarta uma das fitas do miRNA de fita dupla e usa o RNA de fita simples remanescente para localizar uma molécula de RNA estranha complementar (Figura 8-27). Essa molécula de RNA marcada é então rapidamente degradada, deixando o complexo RISC livre para procurar mais das mesmas moléculas de RNA estranho.

O RNAi é encontrado em uma grande variedade de organismos, incluindo fungos unicelulares, plantas e vermes, indicando que são evolutivamente antigas. Em alguns organismos, incluindo plantas, a atividade de RNAi pode espalhar-se de tecido a tecido pelo deslocamento do RNA entre células. Essa transferência de RNA permite à planta inteira tornar-se resistente a um vírus depois que apenas poucas das suas células tenham sido infectadas. Em um sentido amplo, a resposta de RNAi lembra certos aspectos do sistema imune humano. Em ambos os casos, um organismo infeccioso estimula a produção de moléculas de "ataque" (siRNAs ou anticorpos) personalizadas e designadas para inativar o invasor, protegendo, assim, o hospedeiro.

Cientistas podem usar a interferência de RNA para ativar e desativar genes

A descoberta de miRNAs, siRNAs e os mecanismos de RNAi têm sido vistos com grande entusiasmo. Em um sentido prático, a RNAi tem-se tornado uma ferra-

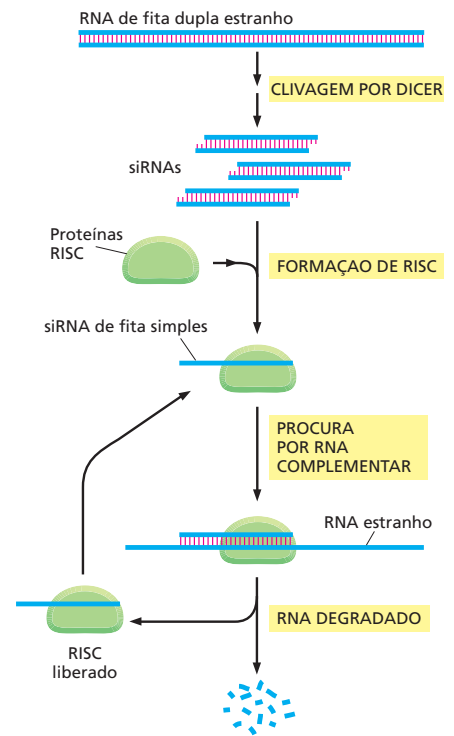
Figura 8-27 siRNAs destroem RNAs estranhos. RNAs fita dupla, de um vírus ou elemento geneticamente transponível, são primeiramente clivados por uma nuclease chamada Dicer. Os fragmentos fita dupla resultantes são incorporados nos complexos RISC, os quais descartam uma das fitas da fita dupla e usam a restante para localizar e destruir RNAs complementares. Esse mecanismo forma a base para a interferência de RNA (RNAi).

menta experimental poderosa que permite que cientistas inativem qualquer gene em cultura de células ou, em alguns casos, em plantas ou animais. Discutimos como esse método está sendo usado para ajudar a determinar a função de genes individuais no Capítulo 10.

Ao mesmo tempo, a RNAi apresenta um potencial real como um método poderoso para o tratamento de doenças humanas. Visto que muitas doenças humanas são resultado da expressão inapropriada de genes, a habilidade de inativar esses genes introduzindo moléculas de siRNAs complementares é uma grande promessa médica.

Finalmente, a descoberta de que RNAs desempenham um papel-chave no controle da expressão gênica aumenta nosso entendimento quanto aos tipos de redes regulatórias que as células têm em seu comando. Um dos grandes desfios da biologia neste século seria determinar como essas redes cooperam para especificar o desenvolvimento de organismos complexos, incluindo nós mesmos.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- **Uma célula eucariótica típica expressa somente uma fração dos seus genes, e os distintos tipos de células em organismos multicelulares surgem porque diferentes conjuntos de genes são expressos ao longo da diferenciação celular.**
- **Embora todas as etapas envolvidas na expressão de um gene possam, em princípio, ser reguladas, para a maioria dos genes, o início da transcrição é o ponto mais importante de controle.**
- **A transcrição de genes individuais é ativada ou desativada nas células por reguladores transcricionais. Essas atuam ligando-se a pequenas regiões de DNA chamadas de sequências regulatórias de DNA.**
- **Embora cada proteína de regulação gênica possua características únicas, a maioria se liga ao DNA usando um dentre um pequeno número de motivos proteicos estruturais. A sequência de aminoácidos precisa estar dobrada no motivo de ligação ao DNA que determina a sequência particular de DNA que é reconhecida.**
- **Em bactérias, as proteínas reguladoras normalmente se ligam às sequências regulatórias de DNA próximas de onde a RNA-polimerase se liga e então ativam ou reprimem a transcrição do gene. Em eucariotos, essas sequências regulatórias de DNA são frequentemente separadas do promotor por muitos milhares de pares de nucleotídeos.**
- **Os reguladores transcricionais eucarióticos atuam de duas maneiras fundamentais: (1) eles podem afetar diretamente o processo de montagem da RNA-polimerase e dos fatores gerais de transcrição no promotor, e (2) eles podem modificar localmente a estrutura da cromatina das regiões promotoras.**
- **Nos eucariotos, a expressão de um gene é normalmente controlada por uma combinação de regulares transcricionais.**
- **Nas plantas e nos animais multicelulares, a produção de diferentes reguladores transcricionais em diferentes tipos celulares garante a expressão somente daqueles genes apropriados para o tipo particular de célula.**
- **Células em organismos multicelulares têm mecanismos que permitem sua progênie de "relembrar" que tipo de célula elas deveriam ser.**

- **Uma única proteína de regulação gênica, se expressa na célula precursora apropriada, pode desencadear a formação de um tipo celular especializado ou mesmo de um órgão inteiro.**
- **As células podem também regular a expressão gênica controlando eventos que ocorrem depois que a transcrição tenha se iniciado. Muitos desses mecanismos contam com moléculas de RNA que podem influenciar a sua própria transcrição ou tradução.**
- **MicroRNAs (miRNAs) controlam a expresão gênica pelo pareamento de bases com mRNA específicos, regulando sua estabilidade e tradução.**
- **As células possuem um mecanismo de defesa para a destruição de RNAs de fita dupla "estranhos", muitos dos quais são produzidos por vírus. Cientistas podem tirar vantagem desse mecanismo, chamado de interferência de RNA, para inativar genes de interesse pela simples injeção em células de RNAs fita dupla, cujo alvo são mRNAs produzidos por esses genes.**

TERMOS-CHAVE

ativador
controle combinatório
diferenciação
metilação do DNA
herança epigenética
expressão gênica
microRNA (miRNA)
circuito de retroalimentação positiva
controle pós-transcricional
sequência regulatória de DNA
gene repórter
repressor
riboswitch
interferência de RNA (RNAi)
RNA de interferência pequeno (siRNA)
fator geral de transcrição

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 8-4

Um vírus que cresce em bactérias (vírus bacterianos são chamados de bacteriófagos) pode replicar-se de uma ou duas maneiras. No estado lisogênico (prófago), o DNA viral é inserido no cromossomo bacteriano e é copiado junto com o genoma da bactéria cada vez que a célula se divide. No estado lítico, o DNA viral é liberado do cromossomo bacteriano e se replica muitas vezes na célula. Esse DNA viral produz proteínas do envelope viral que, junto com o DNA replicado, formam muitas novas partículas virais que lisam a bactéria, sendo então liberadas. Essas duas formas de crescimento são controladas por dois reguladores transcricionais, denominados cl ("c um") e Cro, que são codificados pelo vírus. No profago, cl é expressa; no estado lítico, Cro é expressa. Além de regular a expressão de outros genes, cl reprime o gene *Cro*, e Cro reprime o gene *cl* (**Figura Q8-4**). Quando bactérias contendo o fago no estado lisogênico (prófago) são brevemente irradiadas com luz UV, a proteína cl é dagradada.

A. O que acontecerá em seguida?

B. As modificações em (A) serão revertidas quando a luz UV for desligada?

C. Poderia essa resposta à luz UV ter-se desenvolvido?

QUESTÃO 8-5

(Verdadeiro/Falso) Quando o núcleo de uma célula de cenoura completamente diferenciada é injetado em um ovo de rã cujo núcleo tenha sido removido, o núcleo doador injetado é capaz de programar o ovo recipiente a produzir uma cenoura normal. Explique a sua resposta.

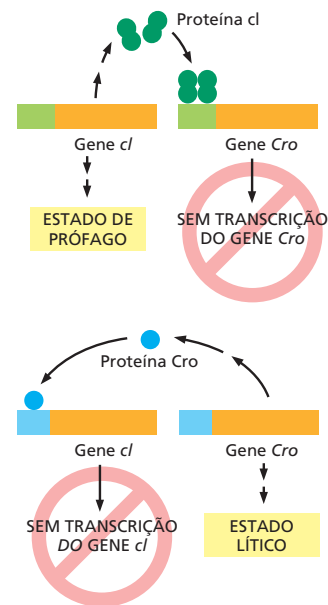



Figura Q8-4

QUESTÃO 8-6

Quais das seguintes afirmações são corretas? Explique suas respostas.

A. Em bactérias, mas não em eucariotos, a maioria dos mRNAs codifica mais de uma proteína.

B. A maioria das proteínas que se ligam ao DNA se liga ao sulco maior da dupla-hélice.

C. Nos principais pontos de controle da expressão gênica (transcrição, processamento de RNA, transporte de RNA, tradução e controle de uma atividade proteica), o início da transcrição é um dos mais comuns.

D. Os átomos de zinco das proteínas de ligação ao DNA que contêm domínios dedo-de-zinco contribuem para a especificidade da ligação pelas interações sequência-específicas que elas formam com as bases.

QUESTÃO 8-7

Sua tarefa no laboratório do Professor Quasímodo é determinar quão longe um estimulador (um sítio de ligação para uma proteína estimuladora) poderia ser deslocado a partir do promotor do gene *straightspine* e ainda ativar a transcrição. Você sistematicamente varia o número de pares de nucleotídeos entre esses dois sítios e então determina a quantidade de transcrição pela medição da produção do mRNA de Straightspine. Em um primeiro momento, os seus dados parecem confusos (**Figura Q8-7**). O que você esperaria para os resultados desse experimento? Você consegue salvar a sua reputação e explicar os seus resultados para o Professor Quasímodo?

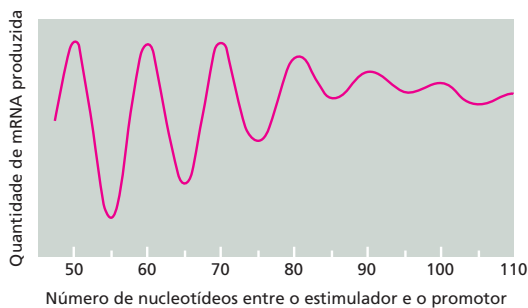



Figura Q8-7

QUESTÃO 8-8

Muitos reguladores transcricionais formam dímeros de subunidades idênticas. Por que isso é vantajoso? Descreva três motivos estruturais que sejam frequentemente usados para interagir com o DNA. Quais são as características especiais que os tornam apropriados para esse objetivo?

QUESTÃO 8-9

O repressor λ se liga na forma de dímero em sítios críticos no genoma de λ, a fim de manter os genes líticos desativados, o que estabiliza o estado de prófago (integrado). Cada molécula do repressor consiste em um domínio N-terminal de ligação ao DNA e um domínio C-terminal responsável pela dimerização (**Figura Q8-9**). Sob indução (p. ex., por irradiação com luz UV), os genes para crescimento lítico são expressos, as progênies de λ são produzidas, e a célula bacteriana é lisada. A indução é iniciada pela clivagem do repressor λ em um sítio entre o domínio de ligação ao DNA e o domínio responsável pela dimerização. Na ausência de repressor ligado, a RNA-polimerase se liga e inicia o crescimento lítico. Dado que o número (concentração) de domínios de ligação ao DNA não está alterado pela clivagem do repressor, por que você supõe que a sua clivagem resulta na sua remoção do DNA?

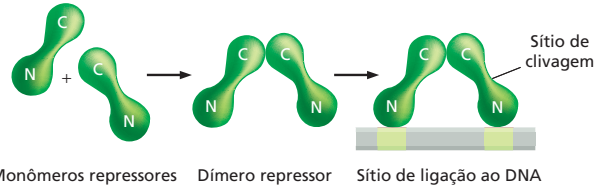



Figura Q8-9

QUESTÃO 8-10

As enzimas para a biossíntese de arginina estão localizadas em várias posições ao redor do genoma de *E. coli*, e elas são reguladas coordenadamente por uma proteína de regulação gênica codificada pelo gene *ArgR*. A atividade de ArgR é modulada por arginina. Com a ligação da arginina, ArgR altera a sua conformação, modificando drasticamente sua afinidade pelas sequências regulatórias nos promotores dos genes das enzimas de biossíntese de arginina. Dado que ArgR é um repressor gênico, você esperaria que ArgR se ligasse mais ou menos fortemente a sequências regulatórias quando a arginina estiver abundante? Se, em vez disso, ArgR funcionasse como um ativador gênico, você esperaria que a ligação da arginina aumentasse ou diminuísse a sua afinidade pelas sequências regulatórias? Explique as suas respostas.

QUESTÃO 8-11

Quando inicialmente se descobriu que os estimuladores influenciam a transcrição de promotores remotos, dois modelos principais foram invocados para explicar essa ação à distância. No modelo de "alça de DNA", interações diretas entre as proteínas ligadas nos estimuladores e promotores foram propostas como os estimuladores do início da transcrição. Nos modelos de "sondagem" ou "sítio de entrada", foi proposto que a RNA-polimerase (ou fator de transcrição) se liga ao estimulador e sonda o DNA até que ela encontre o promotor. Esses dois modelos foram testados usando um estimulador sobre um pedaço de DNA e um gene de β-globina e promotor em um pedaço separado de DNA (**Figura Q8-11**). O gene de β-globina não foi expresso a partir da mistura dos pedaços. Quando os dois segmentos de DNA foram reunidos através de um conector proteico, o gene de α-globina foi expresso.

Como esse experimento discrimina o modelo de alça de DNA e o modelo de sondagem? Explique a sua resposta.

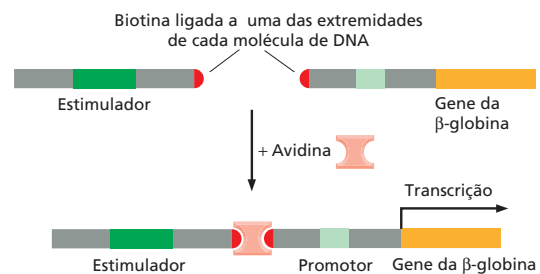



Figura Q8-11

QUESTÃO 8-12

Todas as células diferenciadas em um organismo contêm os mesmos genes. (Entre as poucas exceções a essa regra estão células do sistema imune de mamíferos, onde a formação de células especializadas se baseia em pequenos rearranjos no genoma.) Descreva um experimento que substancie a primeira sentença dessa questão e explique por que ele o faz.

QUESTÃO 8-13

A Figura 8-19 mostra um esquema simples pelo qual três reguladores transcricionais poderiam ser usados durante o desenvolvimento para criar oito tipos celulares diferentes. Quantos tipos celulares você poderia criar, usando as mesmas regras, com quatro reguladores transcricionais diferentes? Como descrito no texto, MyoD é um regulador transcricional que por si próprio é suficiente para induzir expressão gênica específica de músculos em fibroblastos. Como essa observação se encaixa no esquema da Figura 8-19?

QUESTÃO 8-14

Imagine as duas situações mostradas na **Figura Q8-14**. Na célula I, um sinal transitório induz a síntese da proteína A, a qual é um ativador gênico que ativa muitos genes, incluindo o seu próprio. Na célula II, um sinal transitório induz a síntese da proteína R, a qual é um repressor gênico que desativa muitos genes, incluindo o seu próprio. Em qual, se em alguma, dessas situações irão os descendentes da célula original "lembrar-se" de que a célula progenitora experimentou o sinal transitório? Explique o seu raciocínio.

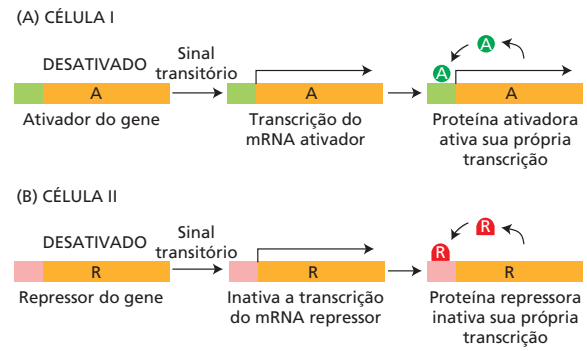
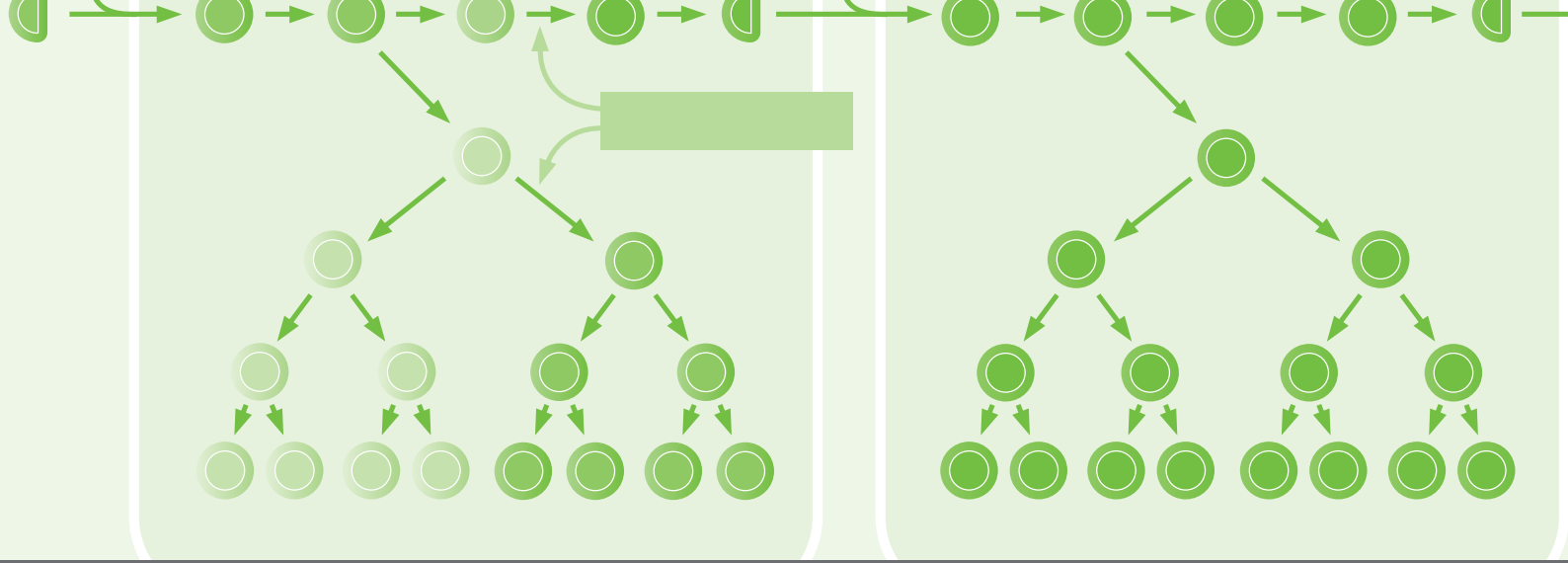



Figura Q8-14

QUESTÃO 8-15

Discuta o seguinte argumento: "Se a expressão de cada gene depende de um conjunto de reguladores transcricionais, então, a expressão desses reguladores transcricionais também precisa depender da expressão de outros reguladores transcricionais, e a sua expressão precisa depender de ainda outros reguladores transcricionais, e assim por diante. As células iriam, dessa maneira, necessitar de um infinito número de genes, a maioria dos quais codificaria para reguladores transcricionais". Como a célula consegue arranjar-se para alcançar o impossível?

CAPÍTULO 9

Como Genes e Genomas Evoluem

Um indivíduo de uma espécie está longe de ser uma cópia exata de outro. Olhe para qualquer multidão de pessoas em uma sala de aula ou em um ônibus: cada indivíduo se diferencia por um conjunto de características herdáveis – cor do cabelo, cor dos olhos, cor da pele, altura, biotipo e assim por diante (**Figura 9-1**). Embora sejamos todos membros de uma mesma espécie, nossos genomas não contêm exatamente as mesmas informações.

Tais diferenças nas sequências nucleotídicas entre um organismo e outro fornecem a matéria-prima na qual a evolução trabalha. Esculpida por pressões seletivas por meio de bilhões de gerações celulares, desde o começo da vida na Terra, essas mudanças têm produzido essa espetacular miscelânea das formas de vida atuais, das bactérias às baleias. A diversidade das espécies, portanto, depende de um balanço delicado entre a acuidade conservativa da replicação do genoma que possibilita à progênie herdar as virtudes dos seus pais e dos erros criativos da replicação e da manutenção do genoma que possibilitam à progênie adquirir novas características e evoluir novas capacidades. Se esse balanço fosse moldado diferentemente, toda a história da vida na Terra teria sido diferente.

Neste capítulo, discutiremos como os genes e os genomas se alteram com o decorrer do tempo. Examinaremos os mecanismos moleculares pelos quais as alterações genéticas ocorrem e consideraremos como a informação nos genomas atuais pode ser decifrada, a fim de produzir um registro histórico dos processos evolutivos que os moldaram. Finalizaremos o capítulo dando uma ênfase maior no genoma humano, para vermos o que a nossa própria sequência de DNA nos diz a respeito do que somos e de onde viemos.

Figura 9-1 **Um grupo de crianças escolares inglesas refletem o conceito de variação.** Pequenas diferenças na sequência de nucleotídeos somam para diferenças na aparência entre um indivíduo e outro. (Cortesia de Fiona Pragoff, Wellcome Images.)

GERANDO VARIAÇÃO GENÉTICA

A evolução trabalha nas sequências de DNA que cada organismo herda de seus ancestrais: não há nenhum mecanismo natural para fazer longos trechos de uma nova sequência nucleotídica. Nesse sentido, nenhum gene – ou genoma – é sempre inteiramente novo. A evolução é mais um retificador do que um inventor: a impressionante diversidade de forma e função que vimos nos sistemas vivos é todo o resultado de variações de temas preexistentes.

Como a variação é o empilhamento da variação por milhões de gerações, o efeito acumulativo é uma mudança radical. Alguns tipos básicos de alteração genética são cruciais na evolução (**Figura 9-2**):

- *Mutação intragênica:* um gene existente pode ser modificado por mutações que alteram um único nucleotídeo, ou que deletam ou duplicam um ou mais nucleotídeos. Essas mutações podem alterar a atividade ou a estabilidade de uma proteína, modificando a sua localização na célula, ou afetando suas interações com outras proteínas.
- *Mutação dentro de uma sequência regulatória de um gene:* quando e onde um gene é expresso pode ser afetado por mutações em trechos de sequências de DNA que regulam sua atividade (descrito no Capítulo 8). Por exemplo, humanos e peixes têm um surpreendente grande número de genes em comum, mas modificações na regulação de tais genes compartilhados constituem a base das diferenças mais drásticas entre tais espécies.
- *Duplicação gênica:* um gene existente, um segmento maior de DNA, ou mesmo um genoma inteiro podem ser duplicados, criando um conjunto de ge-

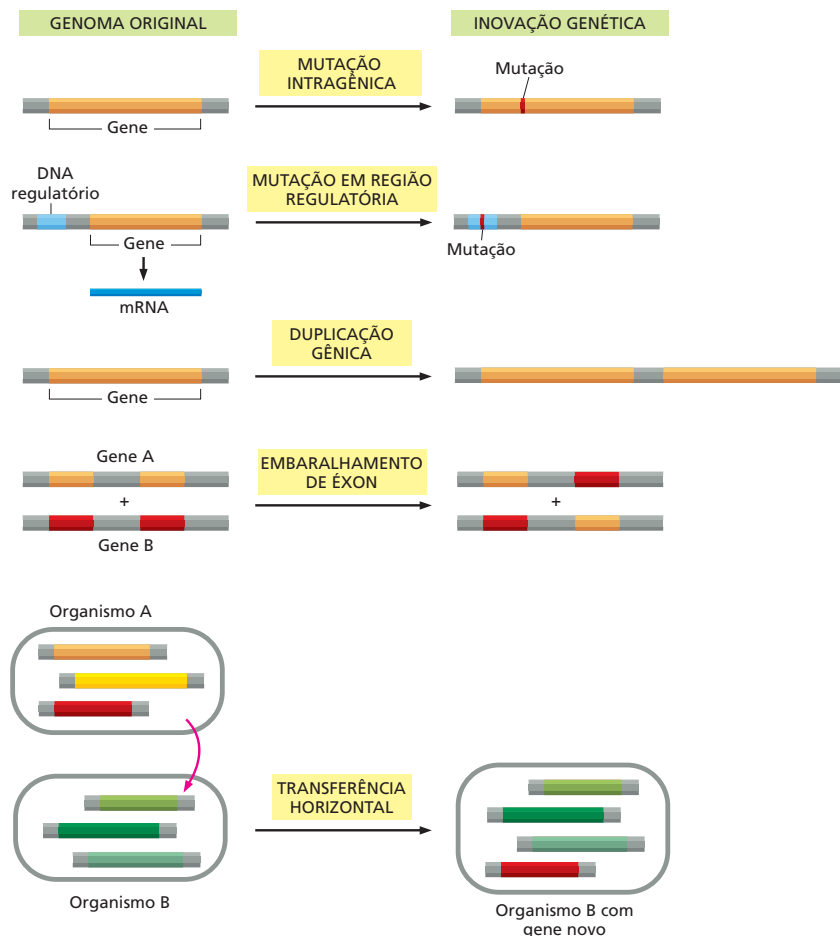



Figura 9-2 Genes e genomas podem ser alterados por diferentes mecanismos. Pequenas mutações, duplicações, deleções, rearranjos e mesmo a infusão de material genético fresco, tudo contribui para a evolução do genoma.

nes intimamente relacionados dentro de uma única célula. Enquanto essa célula e sua progênie se dividem, esses genes duplicados podem então sofrer mutações adicionais e assumir funções distintas daquelas dos genes originais.

- *Embaralhamento de éxons:* dois ou mais genes existentes podem ser quebrados e religados para formarem um gene híbrido contendo segmentos de DNA que originalmente pertenciam a genes separados. A quebra e a religação frequentemente ocorrerem dentro de sequências intrônicas nas células eucarióticas. Como essas sequências são finalmente removidas por *splicing* de RNA, esse processo não necessita ser preciso para resultar em um gene funcional.
- *Transferência horizontal de genes:* um pedaço de DNA pode ser transferido do genoma de uma célula para o de outra – mesmo de outra espécie. Esse processo, raro entre os eucariotos, mas comum entre os procariotos, difere da transferência "vertical" usual da informação genética dos pais para a progênie.

Cada uma dessas formas de variação genética – das mutações simples que ocorrem dentro de um gene às mais extensivas duplicações, deleções, rearranjos e adições que ocorrem dentro de um genoma – tem desempenhado um papel importante na evolução dos organismos modernos. E ainda desempenham esse papel, pois os organismos continuam a evoluir. Nesta seção, discutiremos esses mecanismos básicos de alteração genética e consideraremos as suas consequências para a evolução genômica. Contudo, primeiro, faremos uma pausa para considerar as complicações do sexo – mecanismo pelo qual muitos organismos usam para passar a informação genética para as gerações futuras.

QUESTÃO 9-1

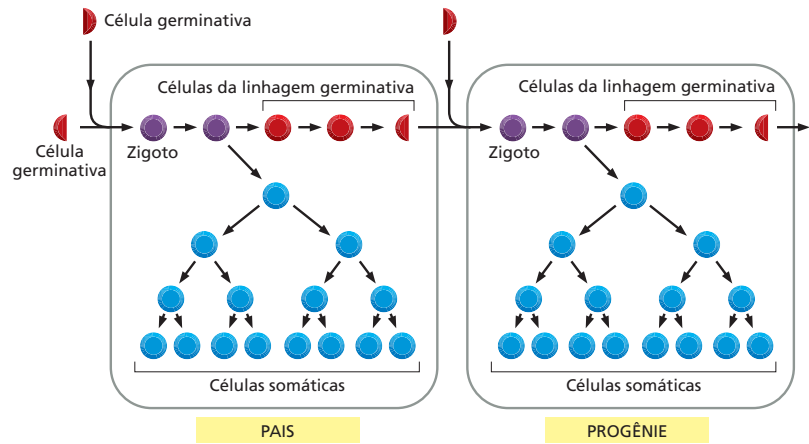
Neste capítulo, questiona-se se a variabilidade genética é benéfica para uma espécie porque aumenta a habilidade dessa em adaptar-se a condições modificadas. Por que, então, uma célula não mede esforços para assegurar a fidelidade da replicação do DNA?

Em organismos que se reproduzem sexualmente, apenas modificações na linhagem germinativa são passadas para a progênie

Para bactérias e outros organismos unicelulares que se reproduzem assexuadamente, a herança da informação genética é bastante simples. Cada indivíduo copia seu genoma e então se divide em dois, originando dois irmãos. Tais organismos possuem uma árvore familiar que é um diagrama ramificado simples de divisões celulares ligando diretamente cada indivíduo à sua progênie e aos seus ancestrais.

Para um organismo multicelular que se reproduz sexuadamente, as conexões familiares são consideravelmente mais complexas. Para começar, sexo mistura e combina genomas de dois indivíduos para gerar uma prole geneticamente distinta dos seus pais. Ele também faz uso de embaixadores geneticos – células designadas especificamente para carregar uma cópia do genoma do indivíduo para a próxima geração. Essas células reprodutivas especializadas – **células germinativas** *ou gametas* – juntam-se durante a fertilização para originarem um novo indivíduo (como discutiremos no Capítulo 19). Todas as outras células do corpo – as **células somáticas** – estão fadadas a morrer sem deixar descendentes de si próprias (**Figura 9-3**). A linhagem celular que origina as células germinativas é chamada de **linhagem germinativa** e é por meio das sequências de divisões da célula da linhagem germinativa que cada indivíduo rastreia a sua descendência até os seus ancestrais e, finalmente, até os ancestrais de todos nós – a primeira célula que existiu, na origem da vida há mais de 3,5 bilhões de anos. Nesse sentido, a existência das células somáticas pode ser considerada somente como um auxílio para as células da linhagem germinativa sobreviverem e se propagarem.

Dessa forma, uma mutação é passada para a próxima geração somente se ocorrer na linhagem germinativa. Uma mutação que ocorra em uma célula somática – apesar de ela poder apresentar consequências desastrosas para o indivíduo no qual ela ocorra (p. ex., causando o câncer) – não é transmitida para a progênie do organismo (**Figura 9-4**). Assim, na busca das alterações genéticas que se acumulam durante a evolução, nossa concentração será nos eventos que ocorrem na linhagem germinativa.

Figura 9-3 **Células da linhagem germinativa e células somáticas têm fundamentalmente funções diferentes.** Em organismos que se reproduzem sexualmente, a informação genética é propagada nas próximas gerações por células especializadas chamadas de células da linhagem germinativa (em *vermelho*). Essas dão origem às células reprodutivas – células germinativas (metades de círculos *vermelhos*). Células germinativas são ilustradas como metades de círculos porque contêm apenas metade do complemento genético de outras células do corpo (círculos inteiros). Quando suas células germinativas se juntam durante a fertilização, elas formas um ovo fertilizado ou zigoto (em *roxo*) que novamente contém um conjunto completo de cromossomos. Esse dá origem a mais células da linhagem germinativa e a células somáticas (*azul*). Células somáticas formam o corpo do organismo, mas não contribuem com seu DNA para a próxima geração.

Embora a reprodução sexual envolva a mistura de genomas – o que influencia como as variações genéticas são propagadas –, muitos dos mecanismos básicos que geram as alterações genéticas são os mesmos para ambos os organismos de reprodução sexuada e assexuada, como discutiremos agora.

Mutações pontuais são causadas por falhas dos mecanismos normais de cópia e manutenção do DNA

Apesar dos mecanismos elaborados que existem para fielmente copiar e manter as sequências de DNA, cada par de nucleotídeos no genoma do organismo corre um risco relativo pequeno de alterar-se cada vez que uma célula se divide. Alterações que afetam apenas um único par de nucleotídeos são chamadas de **mutações pontuais**. Essas alterações normalmente surgem de pequenos erros na replicação ou no reparo do DNA (discutido no Capítulo 6, p. 211-217).

A taxa de mutação nucleotídica tem sido diretamente determinada em experimentos com bactérias, como *Escherichia coli*. Sob condições de laboratório, a *E. coli* se divide cerca de uma vez a cada 20-25 minutos; em menos de um dia. Uma única *E. coli* pode produzir mais descendentes do que o número de humanos na Terra – o suficiente para fornecer uma boa chance para que qualquer mutação pontual possível ocorra. Uma cultura contendo 10^9 células de *E. coli* abriga milhões de células mutantes cujos genomas diferem sutilmente da célula ancestral. Algumas dessas mutações podem conferir uma vantagem seletiva a células individuais: resistência a uma droga, por exemplo, ou a habilidade para sobreviver quando privada de um nutriente básico. Expondo a cultura a uma condição seletiva – adicionando um antibiótico ou removendo um nutriente essencial –,

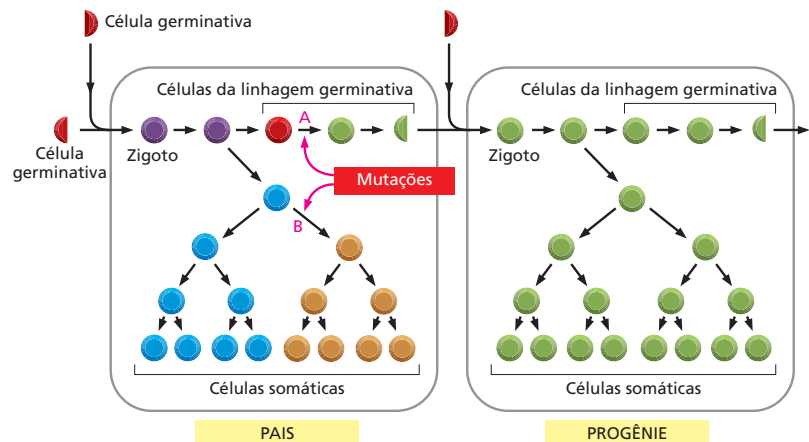



Figura 9-4 **Mutações nas células da linhagem germinativa e células somáticas têm diferentes consequências.** Mutações que ocorrem nas células da linhagem germinativa (A) podem ser passadas para a progênie (*verde*). Aquelas que surgem em células somáticas (B) afetam apenas o indivíduo no qual ocorrem (*laranja*) e não são passadas para a progênie do indivíduo. Como discutido no Capítulo 20, mutações somáticas são responsáveis por muitos cânceres humanos (ver p. 719).

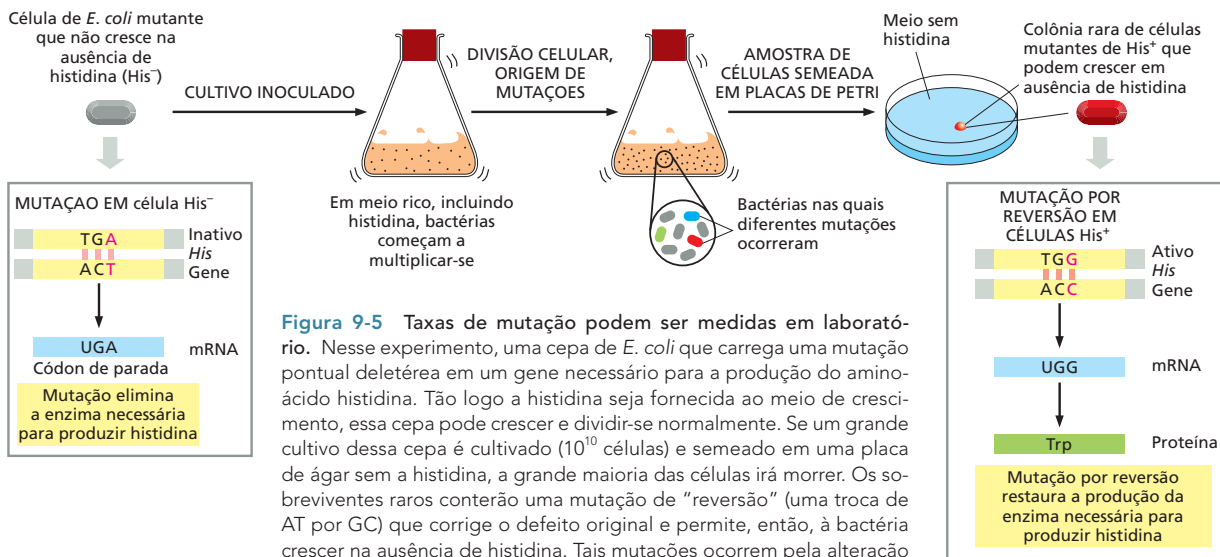



Figura 9-5 Taxas de mutação podem ser medidas em laboratório. Nesse experimento, uma cepa de *E. coli* que carrega uma mutação pontual deletérea em um gene necessário para a produção do aminoácido histidina. Tão logo a histidina seja fornecida ao meio de crescimento, essa cepa pode crescer e dividir-se normalmente. Se um grande cultivo dessa cepa é cultivado (10^{10} células) e semeado em uma placa de ágar sem a histidina, a grande maioria das células irá morrer. Os sobreviventes raros conterão uma mutação de "reversão" (uma troca de AT por GC) que corrige o defeito original e permite, então, à bactéria crescer na ausência de histidina. Tais mutações ocorrem pela alteração e apenas raramente, mas a habilidade em trabalhar com um grande número de células de *E. coli* torna possível detectar tal alteração e com exatidão medir sua frequência. Esse tipo de experimento revelou que a taxa de mutação espontânea em *E. coli* foi de aproximadamente 1 erro para cada 10^9 nucleotídeos copiados.

podem encontrar-se agulhas no palheiro: as células que sofreram uma mutação específica que as possibilitam sobreviver em condições onde as células originais não podem (**Figura 9-5**). Dessa forma, pode determinar-se o quão frequentemente mutações específicas ocorrem. A partir disso, pode estimar-se a frequência de mutações total em *E. coli:* gira em torno de 1 alteração nucleotídica para cada 10^9 pares de nucleotídeos por geração celular. Humanos têm uma taxa de mutação de 0,1 nucleotídeo para cada 10^9 pares de nucleotídeos copiados – que é um décimo daquela de *E. coli*.

As mutações pontuais fornecem uma maneira de modular de maneira fina a função de um gene fazendo pequenos ajustes na sua sequência. Elas também podem eliminar a atividade dos genes. Muito frequentemente, entretanto, não fazem nenhuma das duas coisas. Em muitos sítios no genoma, uma mutação pontual não possui absolutamente nenhum efeito na aparência ou viabilidade do organismo. Essas *mutações neutras* poderiam estar em regiões cuja sequência não é importante, como íntrons. Elas poderiam também alterar a terceira posição de um códon resultando em um mesmo aminoácido, ou podem trocar diretamente um aminoácido por outro relacionado, não afetando a estrutura nem a atividade da proteína.

Mutações pontuais podem alterar a regulação de um gene

Mutações nas sequências codificantes de genes são razoavelmente fáceis de localizar, porque elas alteram a sequência de aminoácidos da proteína resultante de maneiras previsíveis. Mutações em sequências de DNA regulatórias são mais difíceis de reconhecer, pois se parecem com variações menores dentro de longos pedaços de DNA cuja sequência de nucleotídeos real não parece ter importância. Como as sequências regulatórias podem ser localizadas distantes da sequência que codifica o gene, pode ser particularmente difícil identificar esses elementos e as alterações que os afetam.

Apesar dessas dificuldades, muitos exemplos têm sido descobertos onde mutações pontuais em DNA regulatórios têm consequências profundas para o organismo. Por exemplo, um pequeno número de pessoas são resistentes à malária em virtude de uma mutação pontual que afeta a expressão de um receptor de superfície celular ao qual se liga o parasita da malária, *Plasmodium vivax*.

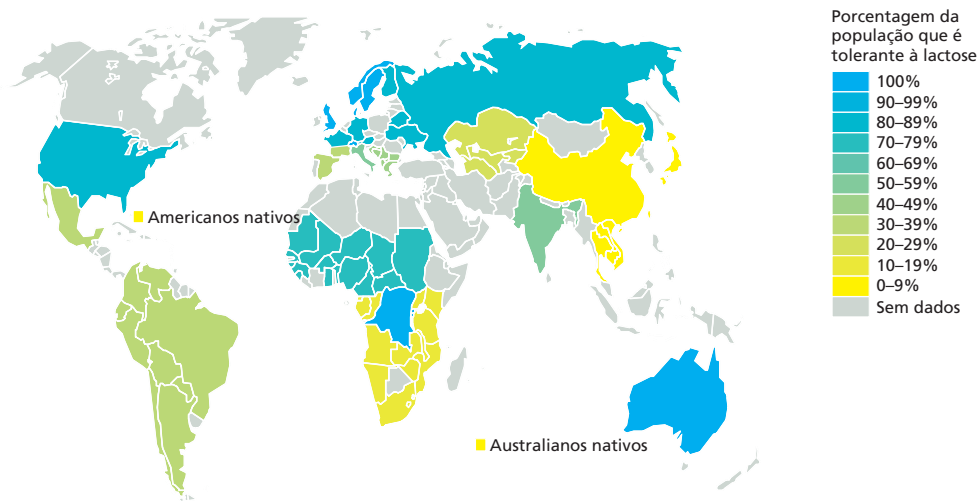



Figura 9-6 A habilidade de humanos adultos em digerir o leite acompanha a domesticação do gado. Há aproximadamente 10.000 anos, humanos no norte da Europa e Africa Central domesticaram o gado e, subsequentemente, disponibilizaram o leite – particularmente durante períodos de fome –, possuindo uma vantagem seletiva aqueles humanos hábeis em digerir a lactose quando adultos. Duas mutações pontuais independentes que permitiram a expressão da lactase em adultos se originaram em populações humanas – uma no norte da Europa e outra na Africa Central. Essas mutações têm-se espalhado em diferentes regiões do mundo. Por exemplo, a migração de europeus nórticos para a América do Norte e Austrália explica por que muitas pessoas vivendo nesses continentes podem digerir a lactose quando adultos, embora a população nativa permaneça intolerante à lactose.

A mutação impede que o receptor seja produzido nos eritrócitos, tornando os indivíduos que carregam essa mutação imunes à infecção. Mutações pontuais em sequências de DNA regulatórias possuem também um papel na nossa habilidade em digerir o açúcar lactose. Nossos ancestrais eram intolerantes à lactose porque a enzima que cliva a lactose – chamada de lactase – era produzida somente na infância. Adultos, que não estavam mais expostos ao leite materno, não necessitavam dessa enzima. Quando humanos começaram a obter o leite de animais domesticados há 10.000 anos, variações de genes apareceram na população humana, permitindo que aqueles indivíduos que as carregassem continuassem a expressar a lactase em adultos. Sabemos hoje que pessoas que digerem leite quando adultas contêm uma mutação pontual na sequência de DNA regulatória do gene da lactase, o que permite uma eficiente transcrição desse gene durante suas vidas. Nesse sentido, adultos que podem digerir a lactose são "mutantes" com relação a essa característica. É surpreendente o quão rápido esssa nova característica se espalhou na população humana, em especial nas sociedades que dependeram muito do leite para a nutrição (**Figura 9-6**).

Essas alterações evolutivas na sequência regulatória do gene da lactase ocorreu relativamente há pouco tempo (10.000 anos atrás), bem depois que os humanos se tornaram uma espécie distinta. Entretanto, alterações muito mais antigas nas sequências regulatórias têm ocorrido em outros genes; algumas delas constituem a base de muitas das profundas diferenças entre as espécies (**Figura 9-7**).

As duplicações do DNA originam famílias de genes relacionados

Mutações pontuais podem influenciar a atividade de um gene existente, mas como os novos genes começam a existir? A duplicação gênica seja talvez o mais importante mecanismo para a geração de novos genes a partir de genes antigos. Uma vez que um gene tenha sido duplicado, uma das duas cópias pode sofrer mutações e tornar-se especializada, a fim de desempenhar uma função

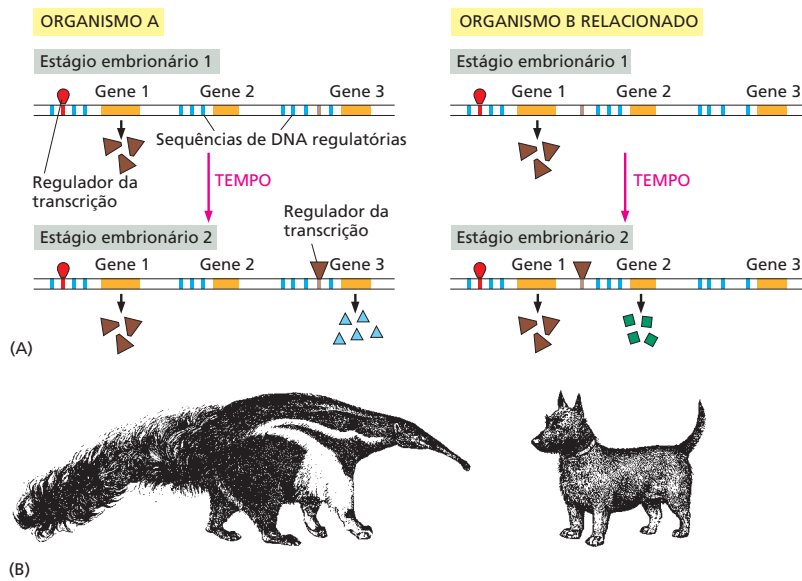



Figura 9-7 Alterações em sequências de DNA regulatórias podem ter consequências drásticas para o desenvolvimento de um organismo. (A) Nesse exemplo hipotético, o genoma dos organismos A e B codificam para o mesmo conjunto de proteínas regulatórias, mas a sequência de DNA regulatória que controla a expressão das proteínas é diferente. Ambos os organismos expressam as mesmas proteínas no estágio 1, mas como há diferenças em sua sequência de DNA regulatória, elas seguem diferentes caminhos no estágio 2. (B) Diferenças na regulação gênica durante o desenvolvimento podem ter profundos efeitos na aparência dos organismos adultos.

diferente, e a outra continua a desempenhar sua função original, ou ambas as cópias podem evoluir e então a função do gene ancestral é dividida entre elas. Essa especialização de genes duplicados em geral ocorre gradualmente, com o acúmulo de mutações nos descendentes da célula original na qual a duplicação gênica ocorreu. Rodadas repetidas desse processo de **duplicação** e **divergência gênicas**, por milhões de anos, podem permitir a um gene dar origem a toda uma família de genes, cada uma com uma função especializada, dentro de um único genoma. A análise das sequências genômicas revela muitos exemplos de tais famílias gênicas: em *Bacillus subtilis,* por exemplo, aproximadamente a metade dos genes possui um ou mais semelhantes em algum local do genoma (**Figura 9-8**). E em vertebrados, a família do gene da globina claramente se originou de um gene único primordial, como veremos. Como a duplicação gênica ocorreu primeiramente?

Acredita-se que muitas duplicações de genes resultam de recombinação homóloga. Esse tipo de recombinação normalmente ocorre apenas quando dois trechos longos de DNA que sejam praticamente idênticos se pareiam com mais frequência na mesma região de DNA em dois cromossomos homólogos (discutido no Capítulo 6, p. 218-221). Em ocasiões raras, a recombinação entre os dois cromossomos irá, ao contrário, ocorrer entre duas sequências de DNA repetidas em lados opostos de um gene. Se ocorrer *crossover*, um dos dois cromossomos resultantes irá então terminar com uma cópia extra do DNA contendo o gene, e o outro irá perdê-la (**Figura 9-9**). Uma vez que um gene tenha sido duplicado dessa maneira, eventos de *crossover* desigual subsequentes podem prontamente adicionar cópias extras ao conjunto duplicado

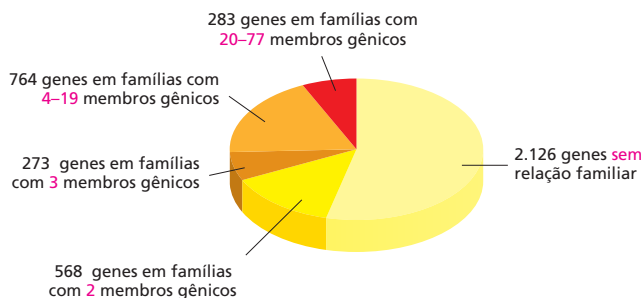



Figura 9-8 O genoma de *Bacillus subtilis* contém muitas famílias de genes relacionados evolutivamente. A maior família gênica no genoma de *B. subtilis* contém 77 genes codificando para uma variedade de transportadores ABC, proteínas que transportam muitos materiais através da membrana celular (discutido no Capítulo 12). (Segundo F. Kunst *et al.*, *Nature* 390:249-256, 1997. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Figura 9-9 A duplicação gênica pode ocorrer por *crossovers* entre sequências repetidas curtas de DNA. Um par de cromossomos homólogos sofre recombinação em uma sequência curta (*vermelho*), a qual contém um gene (*laranja*). Em alguns casos, essas sequências repetidas são resquícios de transposons, os quais estão presentes em muitas cópias no genoma humano (ver Figura 6-35). Quando o *crossover* ocorre como mostrado, o cromossomo longo possui duas cópias do gene circunscrito, e o cromossomo curto possui o gene deletado. O tipo de *crossover* que produz duplicações gênicas é chamada de *crossover desigual*, porque o produto resultante é de tamanho diferente. Se esse processo ocorrer na linhagem germinativa, uma parte da progênie irá herdar o cromossomo longo, ao passo que outros irão herdar o curto.

pelo mesmo mecanismo. Como resultado, não é surpreendente encontrar um conjunto inteiro de genes intimamente relacionados arranjados em série.

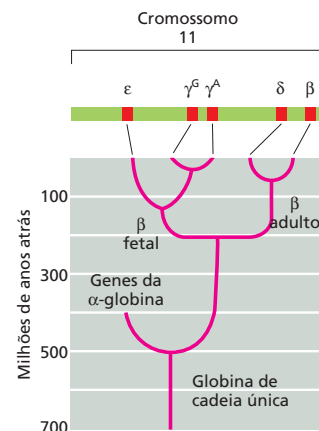
A evolução da família do gene da globina mostra como as duplicações e divergências gênicas dão origem a proteínas produzidas sob medida para um organismo e o seu desenvolvimento

A história evolutiva da família do gene da globina fornece um exemplo particularmente bom de como a duplicação e a divergência geram novas proteínas. As homologias inequívocas na sequência de aminoácidos e na estrutura entre as globinas atuais indicam que elas devem ter derivado de um gene ancestral comum.

A molécula de globina mais primitiva é uma cadeia polipeptídica de aproximadamente 150 aminoácidos, a qual é encontrada em muitos vermes marinhos, insetos e peixes primitivos. Como a nossa hemoglobina, essa proteína transporta moléculas de oxigênio através do corpo do animal. A molécula que carrega oxigênio no sangue de vertebrados superiores adultos e muitos outros vertebrados, entretanto, é mais complexa. Essa proteína é composta por quatro cadeias de globina composta de dois tipos distintos – duas cadeias α e duas cadeias β (**Figura 9-10**). Os quatro sítios de ligação ao oxigênio na molécula $\alpha_2\beta_2$ interagem, permitindo uma alteração alostérica na molécula quando ela se liga e libera o oxigênio. Essa modificação estrutural possibilita à molécula de quatro cadeias da hemoglobina absorver e liberar o oxigênio mais eficientemente do que a versão de uma única cadeia. Essa eficiência é particularmente importante para animais multicelulares grandes, os quais não podem contar com a difusão simples do oxigênio através do corpo para oxigenar seus tecidos adequadamente.

Os genes que codificam para as cadeias α e β são resultantes de duplicação gênica que ocorreu cedo na evolução dos vertebrados. Há cerca de 500 milhões de anos, uma série de duplicações gênicas seguidas de mutações deram origem aos dois ligeiramente diferentes genes que codificam as globinas, um codificando a cadeia α, e outro codificando a cadeia β (**Figura 9-11**). Ainda mais tarde, como os diferentes vertebrados começaram a divergir de um ancestral comum, o gene que codifica a cadeia β aparentemente sofreu sua própria duplicação e divergência para originar um segundo gene que codifica uma cadeia

Figura 9-10 Uma molécula de globina de cadeia única originou a hemoglobina de quatro cadeias utilizadas pelos humanos e outros mamíferos. A molécula de hemoglobina de mamíferos é um complexo de duas cadeias de globinas α e duas β. A globina de cadeia única, a qual é encontrada em alguns vertebrados primitivos, forma um dímero que se dissocia quando se liga ao oxigênio, representando um estágio intermediário na evolução da molécula de quatro cadeias.

Figura 9-11 Ciclos repetidos de duplicação e mutações geraram a família gênica da globina em humanos. Há cerca de 500 milhões de anos, um gene de globina ancestral duplicou e originou a família de globinas β e a família α relacionada. Em vertebrados, uma molécula de hemoglobina é formada a partir de duas cadeias α e duas cadeias β, como mostrado na Figura 9-10. O esquema mostrado foi formulado pela comparação dos genes de globina a partir de muitos organismos diferentes. Por exemplo, as sequências de nucleotídeos dos genes γ^G e γ^A, os quais produzem as cadeias de globina que formam a hemoglobina fetal, são muito mais semelhantes entre si do que qualquer um deles é em relação ao gene β adulto. Em humanos, os genes da β-globina estão localizados agrupados no cromossomo 11. Um evento de quebra cromossômica que ocorreu há cerca de 300 milhões de anos separou os genes das α e β-globinas; os genes da α-globina estão localizados agora no cromossomo 16 humano (não mostrado).

tipo β que é expressa especificamente no feto (ver Figura 9-11). A molécula de hemoglobina resultante possui uma afinidade maior por oxigênio do que a hemoglobina adulta, uma propriedade que auxilia na transferência do oxigênio da mãe para o feto.

Subsequentes rodadas de duplicações em ambos os genes das α e β-globinas deram origem a membros adicionais dessas famílias. Cada um desses genes duplicados tem sido modificado por mutações pontuais que afetam as propriedades da molécula de hemoglobina final, e por alterações nas sequências de DNA regulatórias que determinam quando – e quão fortemente – cada gene é expresso. Como resultado, cada globina difere levemente na sua habilidade em ligar-se e liberar o oxigênio e é bem regulada no estágio de desenvolvimento no qual é expressa.

Além desses genes de globina especializados, existem várias sequências de DNA de globinas duplicadas nos agrupamentos gênicos de α e β-globinas que não são genes funcionais. Esses possuem uma homologia com os genes funcionais, porém foram incapacitados pelo acúmulo de mutações que destroem as proteínas codificadas e impedem a sua expressão. A existência de tais *pseudogenes* torna claro que, como esperado, nem toda duplicação gênica leva a um novo gene funcional. Embora tenhamos nos focado aqui no papel da duplicação e da divergência gênicas relacionadas à evolução dos genes da globina, histórias similares se aplicam a muitas outras famílias de genes presentes no genoma humano.

Duplicações de genomas inteiros têm moldado a história evolutiva de muitas espécies

Praticamente todo gene no genoma de um vertebrado existe em múltiplas versões, sugerindo que mais do que genes individuais tenham sido duplicados pouco a pouco, o genoma inteiro dos vertebrados foi duplicado de uma só vez. Em um estágio anterior na evolução dos vertebrados, parece que o genoma inteiro realmente sofreu duas duplicações sucessivas, originando quatro cópias de cada gene. Em alguns grupos de vertebrados, como os peixes das famílias do salmão e da carpa (incluindo o peixe-zebra; ver Figura 1-39), pode ter havido ainda outra duplicação, criando uma multiplicidade oito vezes maior de genes.

A história precisa da duplicação do genoma inteiro na evolução de vertebrados é difícil de desenhar em virtude das muitas outras alterações que ocorreram desde esses eventos evolutivos ancestrais. Em alguns organismos, entretanto, duplicações de genomas completos são especialmente óbvias, pois ocorreram de forma relativa recentemente – falando em tempos evolutivos. O gênero de rãs *Xenopus,* por exemplo, compreende um conjunto de espécies intimamente semelhantes relacionadas umas com as outras por duplicações ou triplicações repetidas de todo o genoma (**Figura 9-12**). Tais duplicações em grande escala podem acontecer se a divisão celular não ocorrer após uma rodada de replicação do genoma na linhagem germinativa de um indivíduo particular. Uma vez que uma duplicação acidental do genoma ocorre, ela será fielmente transmitida para outras células germinativas no indivíduo e, por fim, para a sua progênie.

Figura 9-12 Diferentes espécies de rãs *Xenopus* possuem diferentes conteúdos de DNA. *X. tropicalis* (acima) possui um genoma diploide normal com dois conjuntos de cromossomos em cada célula somática; a tetraploide *X. laevis* (abaixo) possui um genoma duplicado contendo o dobro de DNA por células. (Cortesia de Enrique Amaya.)

Novos genes podem ser gerados por repetição do mesmo éxon

O papel da duplicação do DNA na evolução não está confinado à expansão de famílias gênicas. Ela também pode atuar em uma escala menor modificando genes únicos pela criação de duplicações internas. Como discutido no Capítulo 4, muitas proteínas são compostas de séries de *domínios* proteicos repetidos. Algumas proteínas – como os anticorpos (ver Figura 4-29) – ou proteínas fibrosas – como os colágenos – são construídas de cópias múltiplas do mesmo domínio ligado em série. Essas proteínas são codificadas por genes que evoluíram por repetidas duplicações de um único segmento de DNA dentro de um gene.

Em eucariotos, cada domínio proteico individual em tais genes é frequentemente codificado por um éxon separado. As duplicações desses domínios pode então ocorrer pela quebra e junção do DNA em qualquer lugar nos íntrons longos em qualquer lado do éxon que codifica para o domínio proteico (Figura 9-13). Sem os íntrons, haveria poucos sítios no gene original no qual uma troca recombinatória entre cromossomos homólogos poderia duplicar o domínio sem danificá-lo. Acredita-se que a evolução das novas proteínas, dessa forma, foi muito facilitada pela organização do DNA eucariótico codificando sequências em uma série de éxons relativamente pequenos separados por longos íntrons não codificantes (ver Figuras 7-17 e 7-18).

Novos genes também podem ser criados pelo embaralhamento de éxons

O tipo de recombinação que permite que éxons sejam duplicados dentro de um gene também pode ocorrer entre dois genes diferentes, juntando dois éxons inicialmente separados que codificam para domínios proteicos muito diferentes – um processo importante chamado de **embaralhamento de éxons**. A falta de precisão que pode ser tolerada em um evento de recombinação que quebra e religa dois íntrons aumenta grandemente a probabilidade de que um evento ocasional de recombinação gere um gene híbrido que ligue éxons dessa maneira. Os resultados presumidos de tais recombinações são vistos em muitas proteínas atuais, as quais são mosaicos de muitos domínios proteicos diferentes (Figura 9-14).

Tem sido proposto que todas as proteínas codificadas pelo genoma humano (aproximadamente 24.000) surgiram da duplicação e do embaralhamento

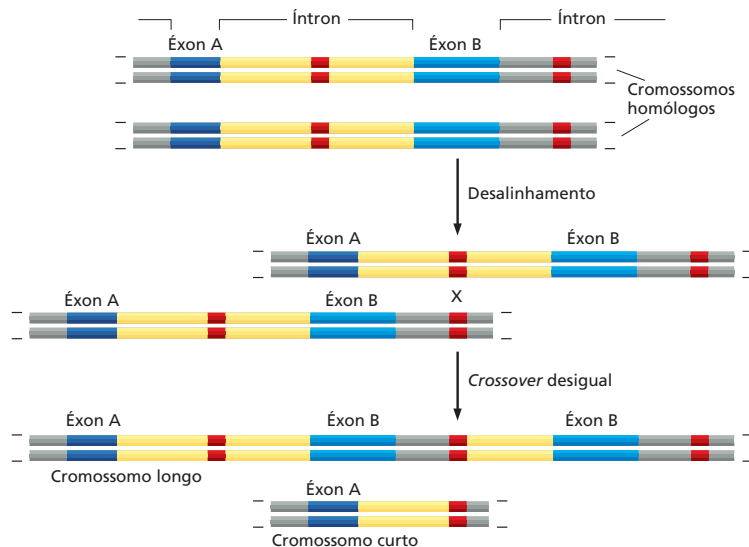
Figura 9-13 Um éxon pode ser duplicado por um evento de recombinação. O esquema geral é o mesmo da Figura 9-9, com uma sequência repetida pequena indicada em *vermelho*; entretanto, está sendo duplicado aqui um éxon dentro de um gene (*azul*), em vez de um gene inteiro. O mRNA transcrito do gene original contém dois éxons, A e B, e o cromossomo longo irá produzir um mRNA com três éxons (A, B e uma segunda cópia de B). Como os éxons duplicados estão ligados por um íntron (*cinza/amarelo*) com suas sequências de *splicing* intactas, a sequência nucleotídica modificada pode ser prontamente submetida ao *splicing* após a transcrição produzindo um mRNA funcional.

de alguns poucos milhares de éxons distintos, cada um codificando um domínio proteico de aproximadamente 30-50 aminoácidos. Essa ideia surpreendente sugere que a grande diversidade das estruturas proteicas é gerada a partir de uma universal muito pequena "lista de partes" emendadas em diferentes combinações.

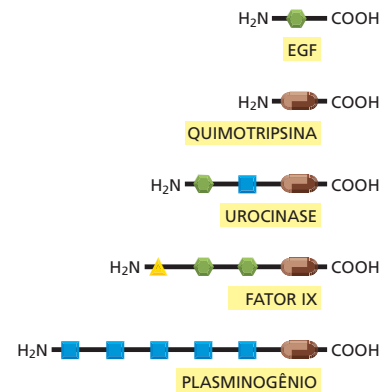
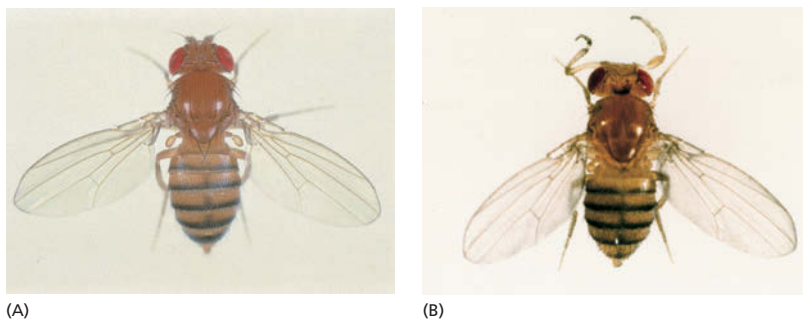
Figura 9-14 Embaralhamento de éxons pode gerar proteínas com novas combinações de domínios proteicos. Cada símbolo representa um tipo diferente de domínio proteico. Durante a evolução, eles foram juntados, ponta a ponta, para criar proteínas humanas atuais, como mostrado aqui.

A evolução dos genomas tem sido acelerada pela movimentação dos elementos genéticos móveis

Os elementos móveis de DNA descritos no Capítulo 6 são outra importante fonte de alterações genômicas e profundamente afetaram a estrutura dos genomas. Essas sequências de DNA parasitas podem colonizar um genoma e podem espalhar-se dentro dele. Durante esse processo, elas frequentemente destroem a função ou alteram a regulação de genes existentes; algumas vezes, eles até mesmo criam novos genes completos por meio de fusões entre as sequências móveis e de segmentos de genes existentes.

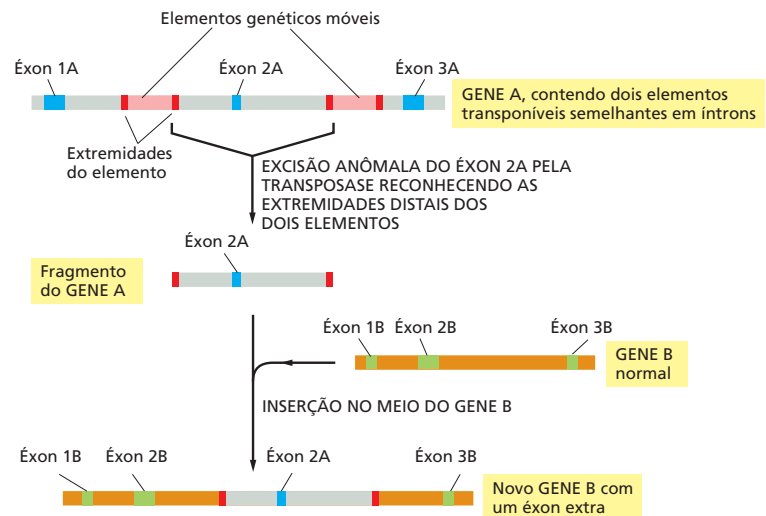
A inserção de um elemento genético móvel dentro de uma sequência codificante de um gene ou dentro da sua região regulatória é uma causa frequente das mutações "espontâneas" que são observadas em muitos organismos. Os elementos genéticos móveis podem romper de forma severa a atividade de um gene se eles se inserirem diretamente em uma sequência codificante. Tal mutação por inserção destrói a capacidade do gene de codificar uma proteína útil. Por exemplo, muitas das mutações no gene do Fator VIII, que causam hemofilia em humanos, são resultantes da inserção de elementos genéticos móveis no gene.

A atividade dos elementos genéticos móveis também pode alterar a maneira pela qual os genes existentes são regulados. Por exemplo, uma inserção de um elemento na região regulatória de um gene terá frequentemente um efeito dramático em onde e quando aquele gene será expresso (**Figura 9-15**). Muitos elementos genéticos móveis carregam sequências de DNA que são reconhecidas por reguladores específicos da transcrição; se esses elementos são inseridos perto de um gene, tal gene pode ser trazido sob o controle desses novos reguladores de transcrição, mudando, assim, o padrão da expressão do gene. Assim, os elementos genéticos móveis podem ser uma fonte significativa de alterações no desenvolvimento, e acredita-se que eles têm sido particularmente importantes na evolução dos planos corporais de plantas e animais multicelulares.

Finalmente, os elementos genéticos móveis também fornecem oportunidades para rearranjos genômicos por servirem de alvos de recombinação homóloga. Por exemplo, acredita-se que a duplicação que deu origem ao agrupamento gênico da β-globina ocorreu pela recombinação homóloga entre sequências semelhantes a *Alu* que estão espalhados por todo o genoma (ver Figuras 9-9 e 6-35). Entretanto, os elementos genéticos móveis também possuem funções mais diretas na evolução dos genomas. Além de eles próprios se moverem, esses elementos parasitas ocasionalmente movem ou rearranjam sequências de DNA

(A)

(B)

Figura 9-15 Mutações derivadas de elementos móveis podem induzir alterações drásticas no plano corporal de um organismo. (A) Uma mosca-das-frutas normal *(Drosophila melanogaster)*. (B) As antenas da mosca foram transformadas em pernas em virtude de uma mutação no DNA regulatório que permite que genes para a construção de uma perna sejam ativados nas posições reservadas para antenas. Embora essa alteração particular não seja muito vantajosa para a mosca, ela ilustra como um rearranjo de DNA causado por um elemento de transposição pode produzir uma alteração importante na aparência do organismo. (A, cortesia de E.B. Lewis; B, cortesia de Matthew Scott.)

Figura 9-16 Os elementos genéticos móveis podem criar novos arranjos de éxons. Quando acontecer de dois elementos genéticos móveis de um mesmo tipo (*vermelho*) se inserirem próximos um do outro em um cromossomo, o mecanismo de transposição poderá ocasionalmente usar as extremidades de dois elementos diferentes (em vez das duas extremidades do mesmo elemento) e assim mover o DNA cromossomal entre eles para um novo sítio cromossômico. Como os íntrons são muito grandes em relação aos éxons, a inserção ilustrada de um novo éxon em um íntron preexistente é um resultado frequente desse tipo de evento de transposição.

vizinhas do genoma do hospedeiro. Quando dois elementos genéticos móveis que são reconhecidos pela mesma transposase se integram em sítios cromossômicos vizinhos, o DNA entre eles pode também ser transposto. Nos genomas eucarióticos, isso fornece uma via particularmente efetiva para o movimento de éxons, gerando novos genes pela criação de novos arranjos dos éxons existentes (Figura 9-16).

QUESTÃO 9-2

Por que você supõe que a transferência horizontal de genes é mais presente em organismos unicelulares do que em organismos multicelulares?

Genes podem ser trocados entre organismos pela transferência horizontal de genes

Até agora consideramos as alterações genéticas que ocorrem dentro do genoma de um organismo individual. Entretanto, genes e outras porções dos genomas também podem ser trocados entre indivíduos de espécies diferentes. Esse mecanismo, conhecido como **transferência horizontal de genes**, é raro entre os eucariotos, mas comum entre bactérias (Figura 9-17).

A *E. coli,* por exemplo, parece ter adquirido pelo menos um quinto do seu genoma de outras espécies nos últimos 100 milhões de anos. Essas trocas genéticas são atualmente responsáveis pela origem de cepas novas e potencialmente perigosas de bactérias resistentes a fármacos. Por exemplo, os genes que conferem resistência a um antibiótico podem ser transferidos de espécie para espécie. Essa troca de DNA fornece à bactéria receptora uma enorme vantagem seletiva na evasão dos compostos antimicrobianos que constituem a linha de frente de ataque da medicina moderna contra infecções bacterianas. Como resultado, muitos antibióticos não são mais efetivos contra infecções bacterianas comuns para as quais eles eram originalmente utilizados. Por exemplo, a maioria das cepas de *Neisseria gonorrhoeae,* a bactéria que causa gonorreia, é hoje resistente à penicilina; esse antibiótico não é mais, portanto, o tratamento principal contra essa doença.

1 µm

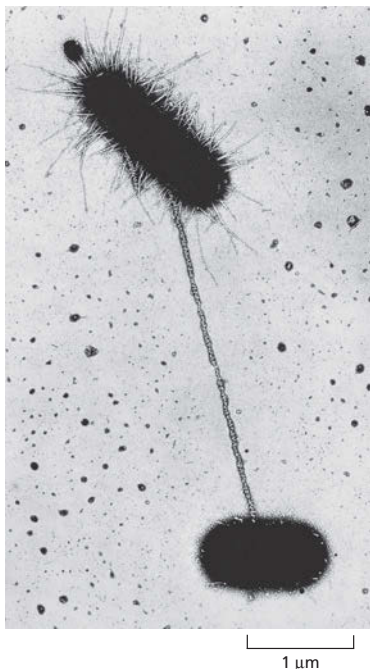



Figura 9-17 As células bacterianas podem compartilhar DNA por um processo chamado de conjugação. A conjugação inicia quando a célula doadora (parte superior) se adere a uma célula recipiente (parte inferior) por um fino apêndice, chamado de pilo sexual. O DNA da célula doadora se move através do pilo sexual para a célula recipiente. Nessa micrografia eletrônica, o pilo foi marcado por vírus que se aderem especificamente a ele, para tornar a estrutura mais visível. A conjugação é uma das várias maneiras pelas quais a bactéria faz a transferência horizontal de genes. (Cortesia de Charles C. Brinton Jr. e Judith Carnahan.)

RECONSTRUINDO A ÁRVORE FAMILIAR DA VIDA

Dados os conhecimentos a respeito dos mecanismos moleculares básicos pelos quais os genomas se alteram, podemos começar a decifrar os rastros de nossa história evolutiva que surge pela comparação e análise das sequências genômicas. Talvez a revelação mais impressionante dessas análises genômicas tenha sido a de que **genes homólogos** – genes que são semelhantes na sua sequência nucleotídica em virtude de uma ancestralidade comum – podem frequentemente ser reconhecidos ao longo de vastas distâncias filogenéticas. Homólogos inequívocos de muitos genes humanos são fáceis de detectar em organismos como vermes, moscas-das-frutas, leveduras e mesmo bactérias. O verme nematoide *Caenorhabditis elegans,* a mosca *Drosophila melanogaster* e o vertebrado *Homo sapiens* – os primeiros três animais para os quais uma sequência genômica completa foi obtida – são parentes muito distantes: acredita-se que a linhagem que leva aos vertebrados divergiu daquela que levou aos nematoides e insetos há mais de 600 milhões de anos. Ainda quando os 19.000 genes de *C. elegans,* os 14.000 genes de *Drosophila* e os 25.000, ou algo em torno, de genes de *Homo sapiens* são comparados sistematicamente, encontramos que cerca de 50% dos genes em cada uma dessas espécies possui homólogos em uma ou ambas as outras duas espécies. Em outras palavras, versões claramente reconhecíveis de pelo menos a metade de todos os genes humanos já estavam presentes no ancestral comum de vermes, moscas e humanos.

Rastreando tais relacionamentos entre os genes, podemos começar a definir as relações evolutivas entre as diferentes espécies, colocando cada bactéria, animal, planta ou fungo em uma única e vasta árvore familiar da vida. Nesta seção, discutiremos como essas relações são determinadas e o que elas podem nos dizer a respeito da nossa herança genética.

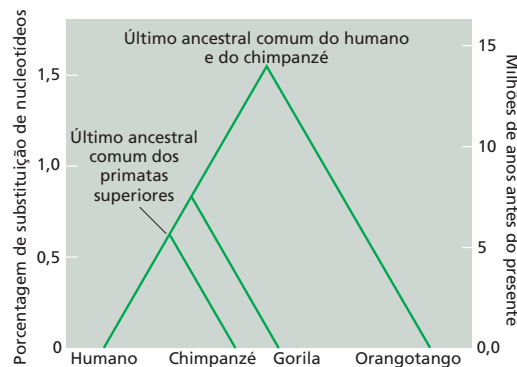
As alterações genéticas que fornecem a um organismo uma vantagem seletiva são as mais prováveis de serem preservadas

Normalmente se acredita que a evolução seja progressiva, mas uma grande parte do processo, em nível molecular, é randômica. Considere o destino de uma mutação pontual. Como discutimos anteriormente, em raras ocasiões, tais mutações podem representar uma mudança para melhor; muito frequentemente, ela não irá causar nenhuma diferença significativa nas potencialidades de um organismo, e algumas vezes ela irá causar um dano sério – pela quebra da sequência codificante para uma proteína-chave, por exemplo. Alterações derivadas de mutações do primeiro tipo tenderão a ser perpetuadas, pois o organismo que as herda terá uma probabilidade aumentada de se reproduzir. Alterações derivadas de mutações do segundo tipo – alterações *seletivamente neutras* – podem ser perpetuadas ou não, porque é uma questão de oportunidade se o organismo mutante ou seus primos que irão obter recursos disponíveis e procriar com sucesso. Por outro lado, as mutações que causam danos sérios não levam a lugar algum: o organismo que os herda morre, levando-o a não produzir progênie. Por meio de repetições intermináveis desse ciclo de tentativa e erro – de mutação e seleção natural –, os organismos gradualmente evoluem. As suas especificações genéticas se alteram, e eles desenvolvem novas maneiras para explorar o ambiente, para sobreviverem na competição com os outros e para se reproduzirem com sucesso.

Claramente, algumas partes do genoma podem acumular mutações com mais facilidade do que outras no curso da evolução. Um segmento de DNA que não codifica para proteína ou RNA e não possui uma função regulatória importante fica livre para alterar-se em uma taxa limitada somente pela frequência das mutações randômicas. Por outro lado, um gene que codifica para uma proteína ou uma molécula de RNA essenciais e altamente otimizadas não pode ser alterado tão facilmente: quando as mutações ocorrem, o organismo defeituoso é quase sempre eliminado. Genes desse último tipo são, portanto, *altamente conservados;* ou seja, as proteínas que eles codificam são muito semelhantes de

QUESTÃO 9-3

Genes altamente conservados como os do RNA ribossomal estão presentes em todos os organismos na Terra como parentes claramente reconhecíveis; dessa forma, eles evoluíram muito lentamente ao longo do tempo. Esses genes "nasceram" perfeitos?

Figura 9-18 **As árvores filogenéticas mostram as relações entre as formas de vida atuais.** Na árvore familiar dos primatas superiores, os humanos aparecem mais próximos de chimpanzés do que de gorilas e orangotangos, pois, quando se compara as sequências nucleotídicas, existem menos diferenças entre humanos e chimpanzés do que entre humanos e gorilas ou humanos e orangotangos. Como indicado, as sequências genômicas das quatro espécies estão estimadas, diferindo da sequência do seu último ancestral comum por aproximadamente 1,5%. Visto que as alterações ocorrerem independentemente em ambas as linhagens divergentes, a divergência entre as duas espécies será duas vezes a quantidade de alterações que ocorrerem entre cada espécie e o último ancestral comum. Por exemplo, os humanos e orangotangos normalmente mostram divergências de sequências de um pouco mais de 3%, enquanto os genomas de humanos e chimpanzés diferem por algo em torno de 1,2%. Embora essa árvore filogenética se baseia apenas nas sequências nucleotídicas, os tempos estimados de divergência, mostrados no lado *direito* do gráfico, derivam dos dados obtidos a partir do registro fóssil. (Modificada a partir de F.C. Chen e W.H. Li, *Am. J. Hum,. Genet.* 68:444-456, 2001. Com permissão de Elsevier.)

organismo para organismo. Ao longo dos 3,5 bilhões de anos ou mais de história evolutiva, a maioria dos genes altamente conservados permanece perfeitamente reconhecível em todas as espécies vivas. Esses últimos genes (que codificam proteínas cruciais, como DNA e RNA-polimerases) são aqueles que precisam ser examinados se desejamos rastrear as relações familiares entre os organismos relacionados de maneira mais distante na árvore da vida.

Por outro lado, se estivermos interessados em espécies mais intimamente relacionadas, é mais informativo focalizar nas alterações seletivamente neutras. Essas alterações se acumulam de maneira constante em uma taxa que é independente de pressões seletivas. Elas, assim, nos fornecem um relógio evolutivo simples e facilmente interpretável que pode ser usado para estimar o tempo transcorrido desde que as duas espécies divergiram de um antepassado comum. Por exemplo, comparações de tais nucleotídeos alterados têm nos levado a construir uma **árvore filogenética** altamente precisa que mostra a evolução dos primatas (**Figura 9-18**).

Os genomas de humanos e chimpanzés são semelhantes em organização, assim como no detalhe das sequências

Os humanos e chimpanzés estão tão intimamente relacionados que é possível reconstruir as sequências gênicas do ancestral comum extinto das duas espécies (**Figura 9-19**). Não apenas os humanos e chimpanzés parecem possuir essencialmente o mesmo conjunto de 25.000 genes, mas esses genes estão arranjados da mesma maneira ao longo dos cromossomos das duas espécies. A única exceção substancial é o cromossomo 2 humano, o qual surgiu da fusão de dois cromossomos que permanecem separados no chimpanzé, no gorila e no orangotango.

As massivas reestilizações dos genomas que podem ser produzidas pelas atividades dos elementos genéticos móveis (discutidos anteriormente neste Capítulo) têm apresentado somente efeitos menores entre os genomas humano e do chimpanzé. Mais de 99% dos milhões de cópias das sequências dos retrotransposons *Alu* que estão presentes em ambos os genomas estão em posições correspondentes, indicando que a maior parte das sequências *Alu* no nosso genoma sofreu duplicação e transposição antes de os humanos e chimpanzés terem divergido. Entretanto, como descrito, os membros da família *Alu* ainda são capazes de transporem-se, como é evidenciado a partir de um pequeno número de casos observados de novas inserções *Alu* causando doenças genéticas humanas. Esses casos envolvem a transposição desse DNA para sítios que estavam desocupados nos genomas dos pais dos pacientes.

Sequências funcionalmente importantes se mostram como ilhas de sequências de DNA conservadas

Quando nos aprofundamos ainda mais retrospectivamente na nossa história evolutiva e comparamos os nossos genomas com aqueles de parentes mais distantes, a situação se altera. As linhagens de humanos e camundongos, por exemplo, di-

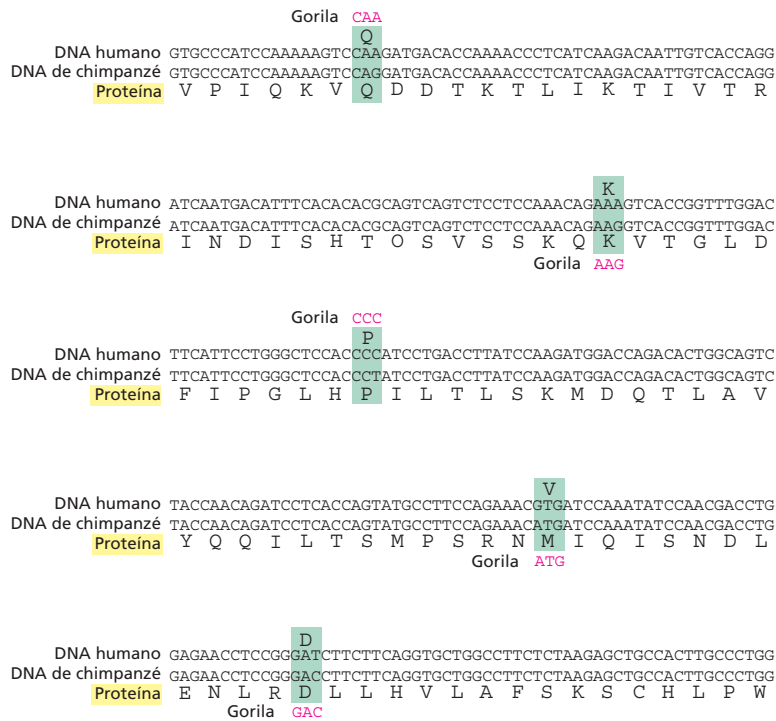



Figura 9-19 Sequências gênicas ancestrais podem ser reconstruídas pela comparação das sequências de espécies atuais intimamente relacionadas. É mostrada aqui, em cinco secções contíguas, a região codificante do gene da leptina de humanos e chimpanzés. A leptina é um hormônio que regula a ingestão alimentar e a utilização de energia. Como indicado pelos códons coloridos em *verde*, somente 5 (de um total de 441 nucleotídeos) diferem entre as sequências de chimpanzés e humanos. Somente uma dessas alterações resulta em uma mudança na sequência de aminoácidos. A sequência do último ancestral comum foi provavelmente a mesma das sequências de humanos e chimpanzés onde elas coincidem; nos poucos lugares onde elas não coincidem, a sequência de gorila (*rosa*) pode ser utilizada como "desempatador." Essa estratégia se baseia na relação mostrada na Figura 9-18: as diferenças entre humanos e chimpanzés refletem eventos relativamente recentes na história evolutiva, e a sequência do gorila revela a sequência mais provável do precursor. Por conveniência, somente os primeiros 300 nucleotídeos da sequência codificante da leptina são mostrados. Os últimos 141 nucleotídeos são idênticos entre humanos e chimpanzés.

vergiram há cerca de 75 milhões de anos. Ambos possuem genomas de tamanhos praticamente iguais, com os mesmos números de genes. Ambos os genomas estão crivados de elementos genéticos móveis. Entretanto, os elementos genéticos móveis em camundongos e humanos, embora similares em sequência, são distribuidos diferentemente. Essa observação implica que os elementos têm proliferado independentemente e se movimentado ao redor do genoma em cada linhagem desde que elas divergiram (**Figura 9-20**). Além do movimento dos elementos genéticos móveis, a organização em larga escala dos genomas tem sido alterada por muitos episódios de quebra cromossômica e recombinação – um total de 180 eventos de "quebra-e-junção" são estimados. Como resultado, as estruturas gerais dos cromossomos têm se modificado. Por exemplo, nos humanos, a maior parte dos centrômeros localiza-se próximo do meio de um cromossomo, ao passo que, em camundongos, são encontrados nas extremidades cromossômicas.

Apesar disso, mesmo com o embaralhamento genético, pode-se ainda reconhecer muitos blocos de **sintenia conservada** – regiões onde genes correspondentes estão enfileirados juntos na mesma ordem em ambas as espécies. Esses genes foram vizinhos na espécie ancestral, e apesar de toda a modificação cromossomal, eles permaneceram vizinhos nas duas espécies até o momento. Mais de 90% dos genomas de camundongos e humanos podem ser divididos

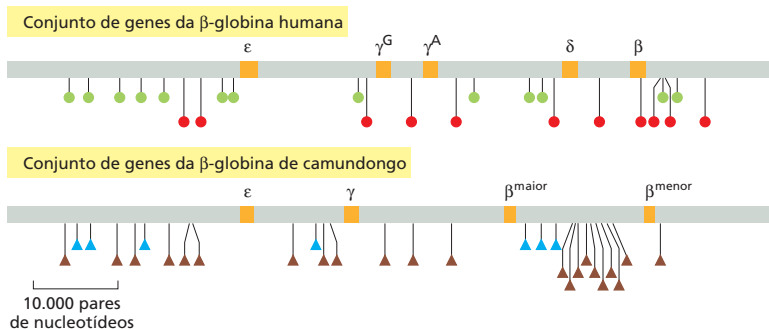



Figura 9-20 As posições dos elementos genéticos móveis nos genomas humano e de camundongo refletem o longo tempo de evolução separando as duas espécies. Essa região do cromossomo 11 humano (introduzido na Figura 9-11) contém cinco genes funcionais semelhantes à β-globina (*laranja*); a região comparável do genoma de camundongo possui somente quatro. Estão indicadas no conjunto de genes da β-globina as posições das sequências *Alu* humanas (círculos *verdes*) e das sequências humanas *L1* (círculos *vermelhos*). No genoma de camundongos, as posições dos elementos *B1* (um parente das sequências *Alu* humanas; triângulos *azuis*) e os elementos *L1* de camundongos (um parente das sequências *L1* humanas; triângulos *marrons*) são mostradas. A ausência de elementos transponíveis dentro dos genes estruturais de globina pode ser atribuída à seleção natural, a qual pode ter eliminado qualquer inserção que comprometesse a função gênica. Os elementos móveis *Alu* e *L1* estão descritos com mais detalhes no Capítulo 6 (p. 222-223). (Cortesia de Ross Hardison e Webb Miller.)

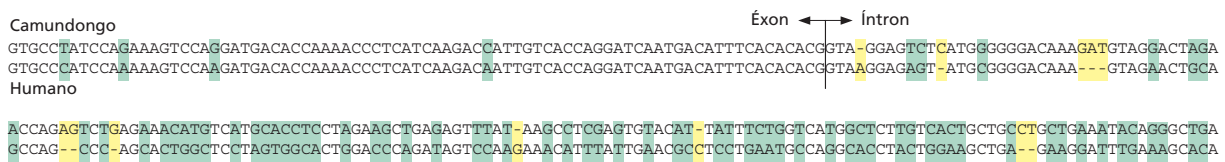



Figura 9-21 O acúmulo de mutações resultou em uma considerável divergência nas sequências nucleotídicas dos genomas humano e de camundongo. São mostradas aqui, em duas secções contíguas, porções das sequências gênicas da leptina de humanos e camundongos. As posições onde as sequências diferem por uma única substituição de nucleotídeos estão indicadas em *verde*, e as posições onde elas diferem pela adição ou deleção de nucleotídeos estão indicadas em *amarelo*. Note que a sequência codificante do éxon é muito mais conservada do que a sequência do íntron adjacente.

nessas regiões correspondentes de sintenia conservada. Dentro dessas regiões, podemos alinhar o DNA do camundongo com o de humanos e comparar as sequências nucleotídicas em detalhe. Tais comparações de sequências amplas de genomas revelam que, nos aproximados 80 milhões de anos desde que humanos e camundongos divergiram de seu ancestral comum, ao redor de 50% de nucleotídeos têm se alterado. Contra esse fundo de dessemelhança, entretanto, alguém pode começar a ver muito claramente as regiões onde as mudanças não são toleradas e as sequências de humanos e camundongos têm permanecido muito mais semelhantes (Figura 9-21). Aqui, as sequências têm sido conservadas pela **seleção purificadora** – ou seja, a eliminação dos indivíduos carregando mutações que interferem em funções importantes.

A força da *genômica comparativa* pode ser aumentada pelo empilhamento de nosso genoma com genomas de outros animais, incluindo rato, galinha e cachorro. Tais comparações têm a vantagem dos resultados do "experimento natural" que tem durado por centenas de milhões de anos, destacando algumas das mais interessantes regiões desses genomas. Essas comparações revelam que aproximadamente 5% do genoma humano consiste em sequências de DNA que são altamente conservadas em muitos outros vertebrados (Figura 9-22). Surpreendentemente, apenas ao redor de um terço dessas sequências codifica para proteínas. Algumas das sequências não codificantes conservadas correspondem a DNA regulatório, e outras produzem moléculas de RNA que não são traduzidas para proteínas. A função da maioria dessas sequências permanece desconhecida. Essa descoberta não esperada tem levado cientistas a concluir que sabemos muito menos sobre biologia celular de vertebrados do que havíamos previamente imaginado. Com enormes oportunidades para novas descobertas, esperamos muitas surpresas pela frente.

Comparações genômicas mostram que os genomas de vertebrados ganham e perdem DNA rapidamente

Retornando ainda mais na evolução, podemos comparar o nosso próprio genoma com o de um peixe. As linhagens de peixes e mamíferos divergiram há aproximadamente 400 milhões de anos. Isso é o suficiente para que a deriva genética e as diferentes pressões de seleção tenham apagado praticamente todos os traços de similaridade entre as sequências nucleotídicas, exceto quando a seleção purificadora tenha operado para impedir mudanças. Regiões conservadas nos genomas humanos e de peixes se sobressaem de forma ainda mais marcante. Nos peixes, pode-se, ainda, reconhecer a maioria dos mesmos genes que em humanos e ainda muitos dos mesmos segmentos de DNA regulatório. Por outro lado, a extensão da duplicação de um dado gene é frequentemente diferente, resultando em diferentes números de membros de famílias gênicas em duas espécies.

Um outro fato que chama a atenção é que, embora todos os genomas de vertebrados tenham aproximadamente o mesmo número de genes, o tamanho total do genoma varia consideravelmente. Como humano, cachorro e camundongo têm todos a mesma escala de tamanho de genoma (3×10^9 pares de nu-

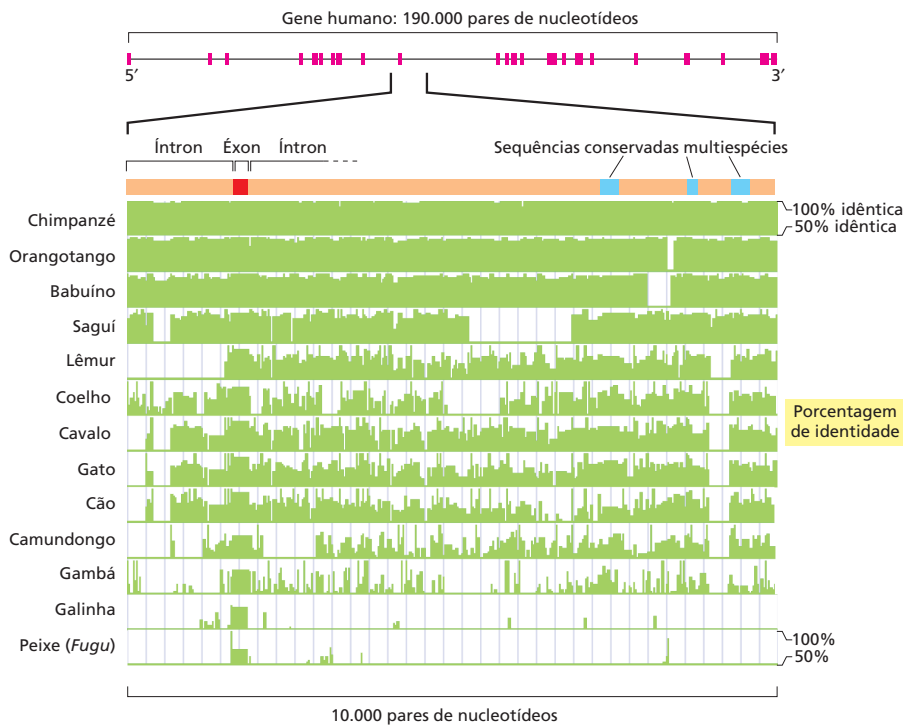



Figura 9-22 Comparação de sequências de nucleotídeos de diferentes vertebrados revela regiões de alta conservação. As sequências de nucleotídeos examinadas nesse diagrama são de um pequeno segmento de um gene humano que codifica uma proteína transportadora da membrana plasmática. Éxons do gene completo (parte superior) estão indicados em *magenta*. Na região ampliada do gene, a posição do éxon está indicada em *vermelho*. Na parte mais abaixo da figura, a sequência de DNA humano está alinhada com a de diferentes vertebrados; a porcentagem de identidade com o gene humano de sucessivas porções de 100 pares de nucleotídeos está anotada em *verde*, com identidades apenas acima de 50% mostradas. A sequência do éxon é conservada em todas as espécies, incluindo galinha e peixe. Três blocos da sequência do íntron que são conservados em mamíferos, mas não em galinha e peixe, são mostrados em *azul*. A função de muitas sequências de íntros conservadas no genoma humano (incluindo essas três) não é conhecida. (Cortesia de Eric D. Green.)

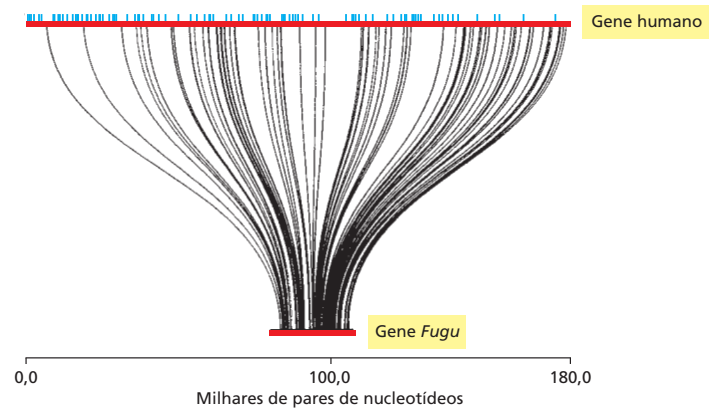
cleotídeos), o genoma de galinha é apenas um terço desse tamanho. Um exemplo extremo de compressão do genoma é o peixe baiacu, *Fugu rubripes* (**Figura 9-23**), cujo genoma é um décimo do tamanho dos genomas de mamíferos, em virtude do pequeno tamanho de seus íntrons. Os íntrons de *Fugu*, assim como outros segmentos não codificantes no genoma do animal, não possuem o DNA repetitivo que aumenta o genoma de muitos mamíferos. Apesar de tudo, as posições de muitos íntrons de *Fugu* são perfeitamente conservadas quando comparadas com suas posições nos genomas de mamíferos (**Figura 9-24**). A estrutura dos íntros de muitos genes de vertebrados já estava presente no ancestral comum de peixes e mamíferos.

Que fatos poderiam ser responsáveis pelas diferenças de tamanho entre os genomas de vertebrados modernos? Comparações detalhadas de muitos genomas têm levado ao achado inesperado de que pequenos blocos de sequências estão sendo perdidos e adicionados a genomas em uma surpreendente rápida taxa. Parece provável que o genoma de *Fugu* seja tão pequeno porque ele perde sequências de DNA mais rapidamente do que as ganha. Durante longos períodos, esse desequilíbrio poderia resultar em uma "limpeza" daquelas sequências de DNA cujo desaparecimento poderia ser tolerado. Fazendo uma retrospectiva, esse processo tem sido muito útil para biólogos: "limpando" o genoma de *Fugu*, a evolução tem generosamente fornecido uma versão reduzida do genoma de um vertebrado no qual as únicas sequências de DNA que permanecem são aquelas que provavelmente têm funções importantes.

Figura 9-23 O baiacu, *Fugu rubripes*, possui um genoma surpreendentemente compacto. Com apenas 400 milhões de pares de nucleotídeos, o genoma do *Fugu* corresponde a somente um quarto do tamanho do genoma do peixe-zebra, mesmo que as duas espécies possuam um número semelhante de genes. (A partir de uma xilogravura de Hiroshige, cortesia de Arts and Designs of Japan.)

A conservação de sequências nos permite rastrear mesmo as relações evolutivas mais distantes

Indo ainda mais retrospectivamente para os genomas de parentes ainda mais distantes – além dos grandes macacos, camundongos, peixes, moscas, vermes, plantas e leveduras até as bactérias –, encontramos cada vez menos semelhanças que pudéssemos reconhecer em nosso próprio genoma. Mesmo por meio dessa enorme divisão evolutiva, a seleção purificadora tem mantido algumas centenas de genes fundamentalmente importantes em todos os domínios do mundo vivo.

Figura 9-24 As posições dos íntrons estão conservadas entre *Fugu* e humanos. Comparação das sequências nucleotídicas dos genes humano e do *Fugu* codificando a proteína huntingtina. Ambos os genes (*vermelho*) contêm 67 éxons curtos que se alinham em uma correspondência de 1:1 um com o outro; esses éxons estão conectados por linhas curvas. O gene humano é 7,5 vezes maior do que o gene do *Fugu* (180.000 contra 24.000 pares de nucleotídeos) em virtude inteiramente da presença de íntrons maiores na sequência humana. O tamanho maior dos íntrons humanos é resultado, em parte, da presença de elementos genéticos móveis cujas posições estão representadas por barras verticais *azuis*. Nos humanos, mutações no gene da huntingtina causa a doença de Huntington – uma doença neurodegenerativa herdada. (Adaptada de S. Baxendale *et al.*, *Nat. Genet.* 10:67-76, 1995. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Pela comparação das sequências desses genes em diferentes organismos e considerando o quão distante eles divergiram, podemos tentar construir uma árvore filogenética que retroceda até os ancestrais originais – as células da origem da vida das quais todos nós derivamos.

Para construir tal árvore, os biólogos se focaram em um gene particular que está conservado em todas as espécies vivas: o gene que codifica para um dos RNAs ribossomais (rRNAs) que é encontrado na menor das duas subunidades ribossomais (ver Figura 7-31). Como o processo de tradução é fundamental a todas as células vivas, esse componente do ribossomo tem sido bem conservado desde cedo na história da vida na Terra (**Figura 9-25**).

Pela aplicação dos mesmos princípios usados para construir a árvore familiar dos primatas (ver Figura 9-18), as sequências nucleotídicas na subunidade menor do rRNA têm sido usadas para criar uma única e abrangente árvore da vida (**Figura 9-26**). Embora muitos aspectos dessa árvore filogenética foram antecipados pela taxonomia clássica (a qual se baseia na aparência externa dos organismos), houve também muitas surpresas. Talvez a mais importante foi a percepção de que alguns dos organismos que eram tradicionalmente classificados como "bactérias" são tão amplamente divergentes nas suas origens evolutivas quanto qualquer procarioto é de qualquer eucarioto. Como discutido no Capítulo 1, parece, agora, que os procariotos incluem dois grupos distintos – as Bacteria e as Archaea – que divergiram precocemente na história da vida na Terra, ou antes dos ancestrais de os eucariotos divergirem como um grupo separado ou aproximadamente ao mesmo tempo. O mundo vivo, dessa forma, possui três divisões ou *domínios:* Bacteria, Archaea e Eukorya (ver Figura 9-26).

Embora nós humanos estejamos classificando o mundo visível desde a antiguidade, agora percebemos que a maioria da diversidade genética da vida se localiza no mundo dos micróbios invisíveis. Tradicionalmente, esses orga-

Figura 9-25 Algumas informações genéticas têm sido conservadas desde o início da vida. Uma parte do gene para o rRNA da subunidade menor (ver Figura 7-31) é mostrada. Os segmentos correspondentes da sequência nucleotídica de três espécies distantemente relacionadas (*Methanococcus jannaschii*, uma Archaea; *Escherichia coli*, uma Bacteria, e o *Homo sapiens*, uma Eukorya) estão alinhados em paralelo. Os sítios onde os nucleotídeos são idênticos entre as espécies estão indicados por um sombreado em *verde*; a sequência humana está repetida na parte de cima do alinhamento de maneira que todos os três tipos de comparações possam ser vistos. Um ponto na metade da sequência de *E. coli* significa um sítio onde um nucleotídeo foi ou deletado da linhagem bacteriana durante o curso da evolução, ou inserido nas outras duas linhagens. Note que todas as sequências desses três organismos distantemente relacionados diferem um do outro em graus levemente semelhantes, apesar de ainda reterem semelhanças indiscutíveis.

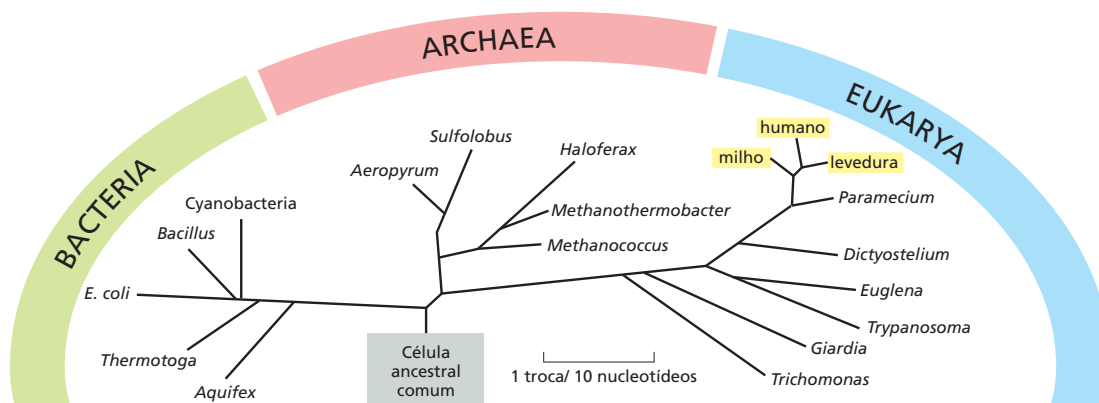



Figura 9-26 **A árvore da vida possui três divisões principais.** Cada ramo está marcado com o nome de um membro representativo daquele grupo, e o tamanho dos ramos corresponde ao grau de diferença nas suas sequências de rRNA da subunidade menor (ver Figura 9-25). Note que todos os organismos que podemos ver a olho nu – animais, plantas e fungos (realçados em *amarelo*) – representam somente um pequeno subconjunto da diversidade da vida.

nismos têm passado despercebidos, a não ser que eles causem doenças ou apodreçam as madeiras de nossas casas. Contudo, os microrganismos constituem a maior parte da massa total de matéria viva em nosso planeta. Somente agora – por meio da análise das sequências de DNA – estamos começando a obter uma representação da vida na Terra que não é grosseiramente distorcida pela nossa perspectiva tendenciosa de animais grandes vivendo em um campo seco.

ANALISANDO O GENOMA HUMANO

Temos visualizado como os genomas gradualmente se alteram através do tempo e como, comparando os genomas de diferentes espécies, são reveladas pistas de suas histórias evolutivas. Examinaremos o nosso próprio genoma, o qual contém numerosas pistas a respeito de onde viemos e de quem somos.

O genoma humano inteiro – todos os $3{,}2 \times 10^9$ pares de nucleotídeos – está distribuído por 22 cromossomos e 2 cromossomos sexuais. A *sequência do genoma humano* se refere à sequência nucleotídica completa do DNA contido nesses 24 cromossomos. Uma ampla variedade de humanos contribuiu com DNA para o projeto de sequenciamento do genoma, e, uma vez que os indivíduos humanos diferem um do outro em uma média de 1 nucleotídeo em 1.000, a sequência do genoma humano publicada é uma composição de muitas sequências individuais. Isso representa tanto a nossa unidade como a nossa diversidade como espécie.

Em seu ponto máximo, o Projeto Genoma Humano gerou sequências nucleotídicas brutas em uma taxa de 1.000 nucleotídeos por segundo, continuamente. A enorme quantidade de informações fornecidas por esse esforço é surpreendente (**Figura 9-27**). Embora muitas décadas passarão antes que os dados sejam completamente analisados, a informação recolhida da sequência genômica humana tem afetado o conteúdo de cada capítulo deste livro. Nesta seção, descreveremos algumas das suas características mais surpreendentes.

Figura 9-27 **O genoma humano remonta à nossa origem.** Se cada par de nucleotídeos for desenhado no tamanho de 1 mm como na escala em (A), então o genoma humano se estenderia por 3.200 km – grande o suficiente para atravessar o centro da África, o sítio de nossas origens humanas (linha *vermelha* em B). Nessa escala, haveria, em média, um gene codificante para proteínas a cada 130 m. Em média, um gene se estenderia por 30 m, mas as sequências codificantes nesse gene encaixadas corresponderiam a pouco mais de um metro.

A sequência de nucleotídeos do genoma humano mostra como os nossos genes estão arranjados

Quando a sequência de DNA do Cromossomo 22 humano, um dos menores cromossomos humanos, foi completada em 1999, foi possível, pela primeira vez, visualizar exatamente como os genes estão arranjados ao longo de um cromossomo de vertebrado inteiro (**Figura 9-28**). Com a publicação do "primeiro rascunho" do genoma humano inteiro em 2001, e a finalização do desenho das sequências em 2004, obtivemos a nossa primeira visão panorâmica da perspectiva genética de todos os cromossomos humanos (**Tabela 9-1**).

A primeira característica genética do genoma humano é o quão pouco dele – somente uma pequena porcentagem – codifica para proteínas, RNAs estruturais e RNAs catalíticos (**Figura 9-29**). Quase metade do DNA remanescente é composto de elementos genéticos móveis, que tem colonizado nosso genoma durante a evolução. Visto que eles têm acumulado mutações, a maioria desses elementos genéticos móveis não pode mais se mover; em vez disso, eles são relíquias de uma era evolutiva anterior quando o movimento dos transposons era extremo em nosso genoma.

QUESTÃO 9-4

Elementos genéticos móveis, como as sequências *Alu*, são encontrados em muitas cópias no DNA humano. De que forma a presença de uma sequência *Alu* poderia afetar um gene próximo?

Uma segunda característica notável do genoma humano é a imensa média de tamanho gênico de 27.000 pares de nucleotídeos. Somente em torno de 1.300 pares de nucleotídeos são necessários para codificar uma proteína de tamanho médio (cerca de 430 aminoácidos, em humanos). A maioria do DNA restante em um gene consiste em longas regiões de DNA não codificante que interrompem os relativamente curtos éxons codificantes de proteínas (ver Figura 9-28D). Além dos íntrons e dos éxons, cada gene está associado a sequências de DNA regulatórias que garantem que o gene seja expresso no nível e no tempo apropriados, e no tipo apropriado de célula. Em humanos, essas sequências regulatórias estão normalmente espalhadas por dezenas de milhares de pares de nucleotídeos, a maioria dos quais é DNA "espaçador".

Éxons e sequências regulatórias compreendem menos de 2% do genoma humano. Em estudos genômicos comparativos, estima-se que 5% do genoma humano seja altamente conservado em relação a outros genomas de vertebra-

Figura 9-28 **A sequência do Cromossomo 22 mostra como os cromossomos humanos são organizados.** (A) O Cromossomo 22, um dos menores cromossomos humanos, contém 48×10^6 pares de nucleotídeos e corresponde a aproximadamente a 1,5% do genoma humano inteiro. A maioria do braço esquerdo do Cromossomo 22 consiste em pequenas sequências repetidas que são empacotadas de uma maneira particular em cromatina (heterocromatina), como discutido no Capítulo 5. (B) Uma expansão de dez vezes de uma parte do Cromossomo 22 mostra em torno de 40 genes. Genes conhecidos estão mostrados em *marrom-escuro*; genes preditos estão em *vermelho*. (C) Uma porção expandida de (B) mostra o comprimento total dos vários genes. (D) O arranjo íntron-éxon de um gene típico é mostrado após uma expansão adicional de dez vezes. Cada éxon (*vermelho*) codifica para uma porção da proteína, e a sequência de DNA dos íntrons (*cinza*) é relativamente sem importância. (Adaptada de The International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* 409:860-921, 2001. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

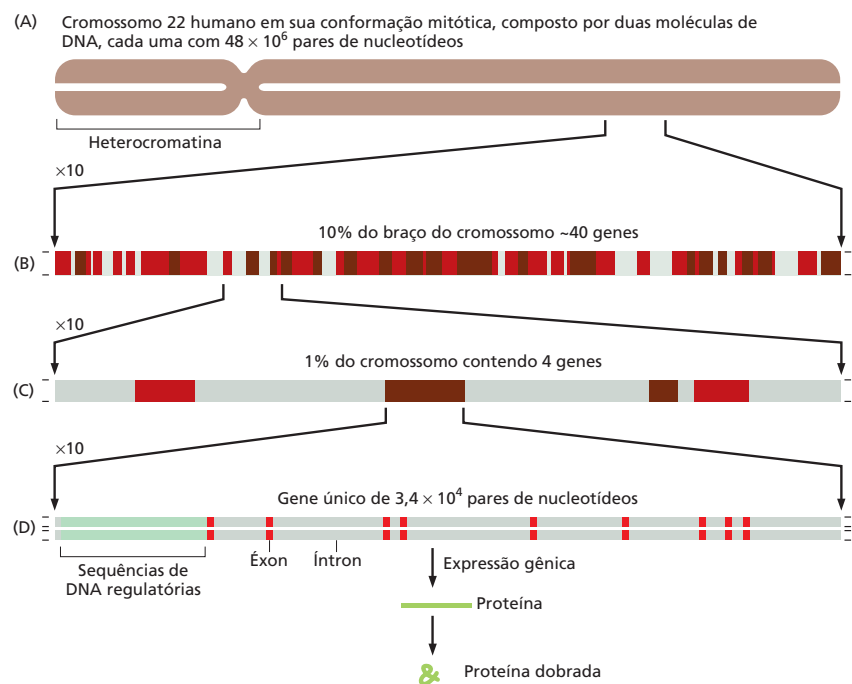



TABELA 9-1 Estatísticas vitais para o genoma humano

Comprimento do DNA	$3{,}2 \times 10^9$ pares de nucleotídeos*
Número de genes	aproximadamente 25.000
Maior gene	$2{,}4 \times 10^6$ pares de nucleotídeos
Tamanho médio dos genes	27.000 pares de nucleotídeos
Menor número de éxons por gene	1
Maior número de éxons por gene	178
Número médio de éxons por gene	10,4
Maior tamanho de éxon	17.106 pares de nucleotídeos
Tamanho médio dos éxons	145 pares de nucleotídeos
Número de pseudogenes**	mais de 20.000
Porcentagem de sequências de DNA nos éxons (sequência codificante para proteínas)	1,5%
Porcentagem de DNA em outras sequências altamente conservadas***	3,5%
Porcentagem de DNA em elementos repetitivos de alto número	aproximadamente 50%

* A sequência de 2, 85 bilhões de nucleotídeos é precisamente conhecida (taxa de erro por volta de apenas um em 100.000 nucleotídeos). O DNA remanescente consiste primariamente em sequências repetidas muito curtas com o número de repetições diferindo de um indivíduo para outro.
** Um pseudogene é uma sequência nucleotídica de DNA muito semelhante à de um gene funcional, mas contendo muitas mutações que impedem a sua expressão apropriada. A maioria dos pseudogenes surgiu da duplicação de um gene funcional seguida pela acumulação de mutações danosas a uma das cópias.
*** Essas incluem DNA que codifica UTRs 5′ e 3′ (mRNAs de regiões não traduzidas), genes para RNAs estruturais e catalíticos, DNA regulatório e regiões conservadas de função desconhecida.

dos, e parece provável então que seja funcionalmente importante (ver Figura 9-22). Não se conhece a função desse outro DNA.

Talvez a mais surpreendente característica do genoma humano seja o número relativamente pequeno de genes. Estimativas anteriores têm estado próximas de 100.000 (ver **Como Sabemos**, p. 318-319). Embora o número exato ainda não esteja certo, estimativas revisadas colocam o número de genes humanos ao redor dos 25.000, trazendo-nos mais próximos dos números gênicos de animais multicelulares mais simples, como *Drosophila* (14.000) e *C. elegans* (19.000).

Finalmente, a sequência nucleotídica do genoma humano tem revelado que a informação crítica que ele carrega parece estar em um estado alarmante de desordem. Como alguém descreveu o nosso genoma: "Em algumas características, ele pode parecer a nossa garagem/quarto/refrigerador/vida: altamente individualista, porém despenteado; pouca evidência de organização; muita confusão acumulada (referida pelos não iniciados como "lixo"), e os poucos itens de valor patenteáveis ficam dispersos por tudo isso indiscriminadamente, aparentemente sem cuidado".

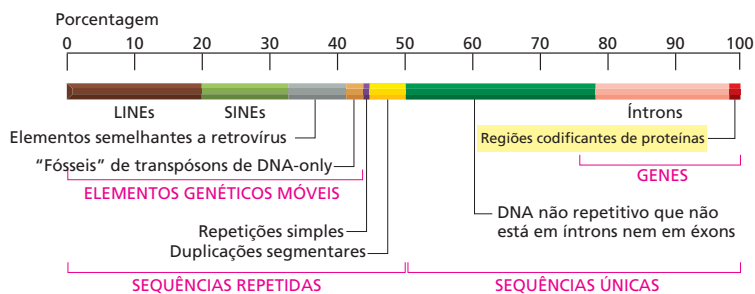



Figura 9-29 A maior parte do genoma humano é constituída de sequências nucleotídicas repetitivas não codificantes. LINEs, SINEs, elementos semelhantes a retrovírus e transpósons de DNA-only são todos elementos genéticos móveis que se multiplicaram em nosso genoma por replicarem-se e inserirem novas cópias em diferentes posições. Esses elementos genéticos móveis são discutidos no Capítulo 6 (p. 222-223). Repetições de sequência simples são sequências nucleotídicas curtas (menos de 14 pares de nucleotídeos) que são repetidas muitas vezes por longas regiões. Duplicações segmentares são grandes blocos do genoma (1.000–200.000 pares de nucleotídeos) que estão presentes em duas ou mais localizações no genoma. Sequências únicas que não fazem parte de íntrons nem de éxons (*verde-escuro*) incluem elementos regulatórios gênicos, assim como sequências cujas funções não são conhecidas. A maioria dos blocos altamente repetidos no DNA presente na heterocromatina ainda não foram completamente sequenciados; então, cerca de 10% das sequências de DNA humano não estão representadas nesse diagrama. (Cortesia de E.H. Margulies.)

COMO SABEMOS:
CONTANDO GENES

Quantos genes precisamos para fazer um humano? Parece ser algo natural esse desejo. Se 6.000 genes podem produzir uma levedura, e 14.000, uma mosca, quantos são necessários para codificar um ser humano – uma criatura complexa, curiosa e inteligente o suficiente para estudar o seu próprio genoma? Até os pesquisadores completarem o primeiro esboço da sequência genômica humana, a estimativa mais frequentemente citada era de 100.000, mas de onde essa dedução veio? E como foi derivada a estimativa revisada de somente 25.000 genes?

Walter Gilbert, um físico que se tornou biólogo e ganhou o Prêmio Nobel por desenvolver as técnicas de sequenciamento de DNA, foi um dos primeiros a emitir uma estimativa aproximada do número de genes humanos. Na metade da década de 1980, Gilbert sugeriu que os humanos poderiam possuir 100.000 genes, em uma estimativa com base no tamanho médio de alguns poucos genes conhecidos naquele tempo (cerca de 3×10^4 pares de nucleotídeos) e no tamanho de nosso genoma (3×10^9 pares de nucleotídeos). Esse cálculo grosseiro produziu um número tão redondo e plausível que ele seria amplamente utilizado em artigos e livros-texto.

O cálculo fornece uma estimativa do número de genes que um humano poderia ter em princípio, mas ele não direciona a questão de quantos genes realmente possuímos. Como se demonstrou, aquela questão não era tão fácil de responder, mesmo com a sequência do genoma completo nas mãos. O problema é: como alguém pode identificar um gene? Aprendemos no Capítulo 5 que os genes são definidos como regiões de DNA que determinam as características de uma célula ou organismo e que esses segmentos de DNA normalmente codificam para uma proteína ou RNA funcional. Agora sabemos que tais segmentos codificantes compreendem somente uma pequena porcentagem do genoma humano. Dessa forma, olhando em um determinado pedaço de sequência de DNA bruto – uma aparentemente corrente randômica de As, Ts, Gs e Cs –, como se pode dizer quais partes são genes e quais partes são "lixo"? Para ser capaz de distinguir de maneira acurada e confiável as sequências codificantes das sequências não codificantes em um genoma, é necessário, antes, que alguém deseje localizar e contar os seus genes.

Sinais e grandes porções

Como sempre, a situação é mais simples em procariotos e eucariotos simples, como as leveduras. Para identificar genes em tais genomas, pode-se procurar essencialmente através da sequência de DNA inteira buscando por **fases abertas de leitura** (**ORFs**). Essas são sequências longas – digamos, 100 códons ou mais – que não possuem códons de parada. Uma sequência randômica de nucleotídeos codificará ao acaso um sinal de parada para a síntese proteica cerca de uma vez a cada 20 códons (pois existem três códons de parada no conjunto de 64 códons possíveis). Dessa forma, encontrar uma ORF, uma sequência de nucleotídeos contínua que codifique mais de 100 aminoácidos, é a primeira etapa na identificação de um bom candidato para um gene presumível. Atualmente, programas para computadores são utilizados para procurar pelas ORFs, os quais começam com um códon de início, normalmente ATG, e terminam com um códon de terminação, TAA, TAG ou TGA (**Figura 9-30**).

Nos animais e plantas, o processo de identificação das ORFs é complicado pela presença de grandes sequências intrônicas que interrompem as porções codificantes dos genes. Como vimos, essas sequências são geralmente muito maiores do que os próprios éxons, os quais representariam somente um pequeno percentual do gene. No DNA humano, os éxons algumas vezes contêm tão pouco quanto 50 códons (150 pares de nucleotídeos), e os íntrons podem ultrapassar 10.000 pares de nucleotídeos em comprimento. Cinquenta códons é muito curto para gerar um "sinal de ORF" estatisticamente significativo, e não é incomum que 50 códons ao acaso não apresentem um sinal de parada. Além disso, os íntrons são tão longos que é provável que eles contenham ao acaso um pouco de "ruído de ORF," regiões numerosas de sequência sem códons de parada. Encontrar as verdadeiras ORFs nesse mar de informação no qual o ruído frequentemente prevalece sobre o sinal é muito difícil. Assim, para identificar genes no DNA eucariótico, também é necessário procurar por outras características distintas que marquem a presença de um gene. Essas incluem sequências de *splicing* que sinalizem uma delimitação íntron-éxon (ver Figura 7-19) ou sequências de DNA regulatórias distintas que se encontrem acima de um gene.

Uma das estratégias mais poderosas para identificar genes é por meio da homologia com genes de outros organismos. Por exemplo, mesmo uma ORF muito curta provavelmente é um éxon se a sequência de aminoácidos que ela codifica corresponder à de outra proteína conhecida de outro organismo. Além disso, se uma ORF presumível for altamente conservada em vários genomas diferentes, é muito provável que codifique uma proteína, mesmo que o gene que a contenha ainda não tenha sido identificado ou estudado em qualquer organismo (ver Figura 9-22). Por meio de tais comparações (p. ex., humano *versus* camundongo *versus* peixe-zebra), é possível identificar pequenas ORFs de função desconhecida e, com mais trabalho, encaixá-las juntos em genes inteiros.

Em 1992, pesquisadores usaram um programa de computador para predizer regiões codificantes para proteínas em dados de sequências humanas preliminares. Eles encontraram dois genes em um segmento de 58.000 pares de nucleotídeos do Cromossomo 4 e cinco genes em um segmento de 106.000 pares de nucleotídeos do Cromossomo 19. Uma média de 1 gene para cada 23.000 pares de nucleotídeos. Extrapolando a partir dessa densidade, para todo o genoma, daria aos humanos aproximadamente 130.000 genes. Revelou-se, entretanto, que os cromossomos que os pesquisadores analisaram haviam sido escolhidos para o sequenciamento precisamente porque eles pareciam ser ricos em genes. Quando a estimativa foi ajustada para levar em conta as regiões pobres em genes do genoma humano – imaginando que metade do genoma humano tivesse talvez um décimo daquela densidade gênica –, o número caiu para 71.000.

Procurando por rótulos

Obviamente, essas estimativas se baseiam naquilo no que pensamos que os genes se pareçam; entretanto, ainda estamos aprendendo como reconhecê-los. Uma estratégia diferente, porém complementar, para contabilizar as regiões codificantes no genoma envolve determinar experimentalmente quantos genes são realmente expressos.

Para determinar quais genes são expressos em um tipo de célula ou tecido particular, os mRNAs de uma variedade de tecidos diferentes são isolados e convertidos em DNAs complementares, ou cDNAs (discutidos no Capítulo 10). Como os mRNAs são produzidos pela transcrição e pelo *splicing* de genes codificantes para proteínas, essa coleção de cDNAs representa as sequências de todos os genes que foram expressos nas células das quais os mRNAs foram obtidos. Os cDNAs são preparados a partir de uma variedade de tecidos, porque o objetivo dessa estratégia é identificar cada gene, e diferentes tecidos expressam genes diferentes. Um benefício adicional em trabalhar com cDNAs vem do fato de que os mRNAs não possuem os íntrons e o DNA "espaçador" não essencial que se situa entre os genes; dessa forma, as sequências de cDNA correspondem diretamente às sequências codificantes no genoma.

Pequenos fragmentos desses cDNAs, chamados de *marcadores de sequências expressas*, ou ESTs (de, *expressed sequence tags),* são então sequenciados; as sequências ESTs resultantes são comparadas com a sequência nucleotídica do genoma inteiro para localizar o gene que contém cada uma. Pela análise cuidadosa de como os ESTs são mapeadas no genoma humano, os pesquisadores chegaram a uma estimativa de aproximadamente 24.000 genes.

Contagem decrescente dos genes humanos

Até agora, a metodologia mais acurada para predizer genes combina diferentes tipos de dados, incluindo (1) análises de ESTs, (2) procuras computadorizadas do genoma por ORFs e por sequências que sinalizem os sítios de *splicing* nas extremidades de cada éxon e (3) comparações com sequências genômicas de outros organismos, em especial outros vertebrados. Essa última metodologia é particularmente poderosa, porque, como vimos neste capítulo, os genomas de vertebrados são suficientemente divergentes para que apenas as porções mais cruciais de seus genomas – os éxons e as sequências regulatórias, por exemplo – sejam semelhantes (Figura 9-22).

Embora todas as estimativas estejam convergindo para cerca de 24.000 a 25.000, ainda poderão passar-se muitos anos antes que possamos ter uma resposta final de quantos genes precisamos para produzir um humano. Por exemplo, genes que codificam para pequenos RNAs, como microRNAs, são particularmente difíceis de identificar. Com o refinamento dos métodos computacionais e com a maior coleta de dados sobre o genoma humano e sobre o genoma de outros organismos, a nossa habilidade para predizer onde os genes residem dentro de uma sequência de DNA particular pode somente aumentar. No final, entretanto, conhecer o número exato de genes não é tão importante quanto entender as funções de cada gene e de como ele interage com outros genes para construir um ser humano. Essas são questões centrais e que estão entre as prováveis que irão ocupar os biólogos por todo este século.

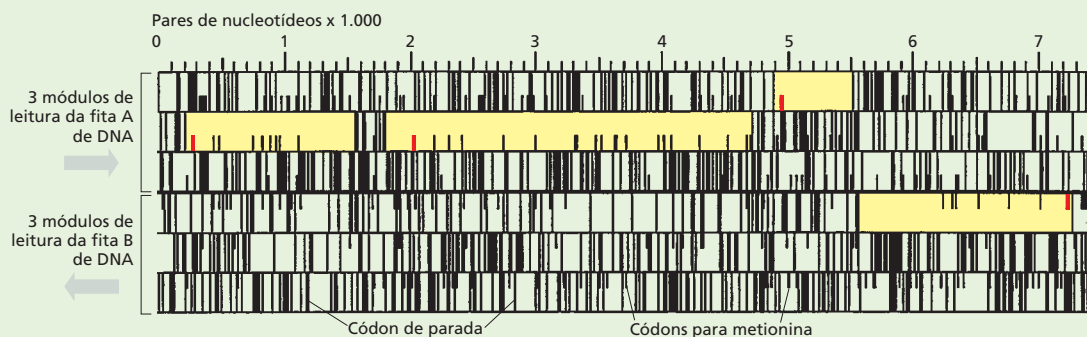



Figura 9-30 **Programas de computador são utilizados para encontrar genes.** Nesse exemplo simples, uma sequência de DNA de 7.500 pares de nucleotídeos da levedura patogênica *Candida albicans* foi colocada em um computador que traduziu a sequência inteira em todos as seis fases abertas de leitura possíveis (ORFs), três de cada fita (ver Figura 7-25). O resultado mostra cada fase de leitura como uma coluna horizontal, com os códons de parada (TGA, TAA e TGA) marcados por longas linhas verticais e códons de metionina (ATG) marcados por linhas mais curtas. Quatro fases de leitura – ORFs – (*amarelo*) podem ser identificadas com clareza pela ausência estatisticamente significativa de códons de parada. Para cada ORF, o presumível códon de iniciação (ATG) está indicado em *vermelho*. Os códons adicionais ATG nas ORFs codificam para metionina.

Modificações aceleradas nas sequências do genoma conservado ajudam a revelar o que nos torna humanos

Tão logo as sequências genômicas de humanos e chimpanzés se tornaram disponíveis, cientistas começaram a procura por sequências de DNA modificadas que poderiam contar para as impressionantes diferenças entre nós e eles. Com 3 bilhões de pares de nucleotídeos para comparar entre duas espécies, isso parecia ser uma tarefa impossível. O trabalho foi feito muito mais facilmente confinando a procura das sequências que são altamente conservadas através de múltiplas espécies de vertebrados (Figura 9-22), representando partes do genoma que são mais prováveis de serem funcionalmente importantes. Embora essas sequências sejam conservadas, elas não são idênticas: quando a versão em uma espécie é comparada com outra, elas são normalmente encontradas para se terem distanciado por uma pequena porção correspondente ao tempo decorrido desde o último ancestral comum. Em uma pequena proporção dos casos, entretanto, podem ver-se sinais de um surto súbito evolutivo. Por exemplo, algumas sequências de DNA que são altamente conservadas em outras espécies de vertebrados se modificaram excepcionalmente rápido durante os seis milhões de anos da evolução humana desde que nós divergimos dos chimpanzés. Pensa-se que tais *regiões aceleradas humanas* refletem funções que têm sido especialmente importantes em nos tornar diferentes de alguma maneira útil.

Em um estudo, em torno de 50 desses sítios foram identificados – um quarto deles estava localizado perto de genes associados ao desenvolvimento neural. A sequência que exibiu a modificação mais rápida (18 trocas entre humanos e chimpanzés, comparada com apenas duas trocas entre chimpanzé e galinha) foi examinada posteriormente e encontrada por codificar uma pequena molécula de RNA não codificante que é produzida no córtex cerebral humano em um momento crucial no desenvolvimento do cérebro. Embora a função desse RNA ainda não seja conhecida, esse excitante achado está estimulando estudos futuros esperando lançar luz sobre as características do cérebro humano que nos distinguem de espécies intimamente relacionadas.

A variação genética dentro do genoma humano contribui para a nossa individualidade

Com a exceção de gêmeos idênticos, não existem duas pessoas com o genoma igual. Quando a mesma região do genoma de dois humanos diferentes é comparada, as sequências nucleotídicas normalmente diferem em torno de 0,1%. Isso deveria parecer um grau insignificante de variação, mas considerando o tamanho do genoma humano, ele se eleva para em torno de 3 milhões de diferenças genéticas em cada conjunto cromossômico maternal ou paternal entre uma pessoa e outra. A análise detalhada dos dados de variação genética humana sugere que a maioria dessa variação já estava presente precocemente na sua evolução, talvez há 100.000 anos, quando a população humana ainda era pequena. Isso significa que uma grande parte da variação genética que possuímos hoje foi herdada de nossos primeiros ancestrais humanos.

A maioria da variação genética no genoma humano toma a forma de alterações de bases únicas chamadas de **polimorfismos de nucleotídeo único** (SNPs, de *single nucleotide polymorphisms).* Esses polimorfismos são simplesmente pontos no genoma que diferem na sequência nucleotídica entre uma porção da população e outra – posições onde uma grande fração da população possui um par de nucleotídeos G-C, por exemplo, e outra possui um A-T (**Figura 9-31**). Dois genomas escolhidos ao acaso na população mundial diferirão por aproximadamente $2{,}5 \times 10^6$ SNPs que são dispersos através do genoma. Visto que os SNPs estão presentes nessa alta densidade, eles fornecem marcadores úteis para a condução de análises genéticas nas quais se pode tentar ligar um traço específico (como uma suscetibilidade a doenças) com um padrão particular de SNPs (como discutido no Capítulo 19). Esse tipo de análise pode levar a avanços em cuidados com saúde por permitir que médicos determinem se um

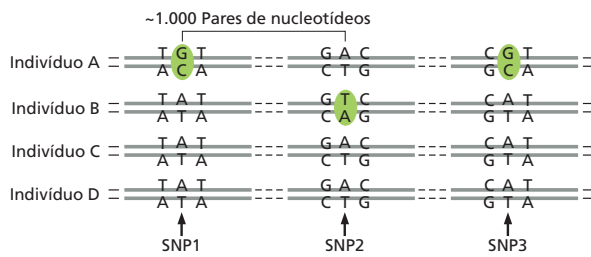



Figura 9-31 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são sequências no genoma que diferem por um único par de nucleotídeos entre uma porção da população e outra. A maioria dessas alterações, mas não todas, no genoma humano, ocorrem em regiões onde a função do gene não é afetada.

indivíduo é suscetível a uma doença, como ataque cardíaco, muito antes que ele mostre seus sintomas. A pessoa pode então alterar o seu comportamento para auxiliar a impedir a doença antes que ela surja.

Outra importante fonte de variação herdada de ancestrais é a duplicação e a deleção de grandes blocos de DNA. Quando o genoma de uma pessoa é comparado com a referência genômica modelo, observa-se aproximadamente 100 diferenças envolvendo longos blocos de sequências. Algumas dessas diferenças são muito comuns, ao passo que outras estão presentes em uma pequena minoria da população. De uma amostra inicial, perto da metade dessas sequências contém genes conhecidos. Em retrospecto, esse tipo de variação não é surpreendente, dada a extensiva história da adição e da perda de DNA em genomas de vertebrados discutida anteriormente. Exatamente como isso contribui para nossa individualidade, entretanto, permance um mistério.

Além dos SNPs, duplicações e deleções que herdamos de nossos ancestrais, os humanos também possuem sequências de nucleotídeos repetidas que são particularmente propensas a novas mutações. Repetições CA, por exemplo, são sequências amplamente encontradas no genoma humano. As sequências nucleotídicas contendo grandes números de repetições CA são, com frequência, replicadas imprecisamente (imagine tentar copiar uma palavra que não é nada mais do que uma corrente de CACACACACACACACA...). O número preciso de repetições pode variar amplamente de um genoma a outro. Por elas apresentarem essa variabilidade excepcional e por essa variabilidade ter surgido tão recentemente, as repetições CA, e outras como elas, tornam-se marcadores genéticos ideais entre humanos individuais. Diferenças no número de CA e outros tipos de repetições em diferentes posições no genoma são usados para a identificação de indivíduos pela análise de DNA em investigações criminais, demandas de paternidade e outras aplicações forenses (ver Figura 10-19).

A maioria das variações na sequência genômica humana são geneticamente silenciosas e se localizam dentro de sequências de DNA em regiões não críticas do genoma. Tais variações não possuem efeitos em como nos parecemos ou como nossas células funcionam. Isso significa que apenas um pequeno subconjunto de variações observado em nosso DNA é responsável por diferenças herdáveis da individualidade humana. Como discutido no Capítulo 19, um desafio maior da genética humana é aprender a reconhecer aquelas relativamente poucas variações que são importantes de modo funcional contra o grande pano de fundo de variações neutras.

QUESTÃO 9-5

Você está interessado em encontrar a função de um gene particular no genoma do camundongo. Você sequenciou o gene, definiu a porção que codifica o seu produto proteico e comparou com o banco de dados; entretanto, nem o gene nem a proteína se parecem com alguma coisa que esteja no banco de dados. Quais tipos de informação a respeito do gene ou da proteína codificada você gostaria de conhecer de forma a estreitar as possíveis funções, e por quê? Concentre-se na informação que você deseja, em vez de quais técnicas você deveria usar para obter aquela informação.

O genoma humano contém ainda muita informação a ser decifrada

Mesmo com a sequência do genoma humano nas mãos, muitas questões continuarão a desafiar os biólogos celulares. A que pode causar maior perplexidade é esta: dado que um humano, um chimpanzé e um camundongo contêm essencialmente os mesmos genes e são, dessa forma, formados pelo mesmo conjunto de proteínas, o que torna essas criaturas tão diferentes?

A resposta, parece, virá em grande parte dos estudos de regulação gênica. As proteínas codificadas no genoma são como componentes de um conjunto de apetrechos de construção. Pela montagem dos componentes em diferentes combinações, muitas coisas diferentes podem ser construídas com o mesmo

Figura 9-32 ***Splicing* alternativo de transcritos de RNA pode produzir muitas proteínas distintas.** As proteínas DSCAM de *Drosophila* são receptores que auxiliam as células nervosas a fazerem as conexões apropriadas. O transcrito de mRNA final contém 24 éxons, quatro dos quais (indicados A, B, C, e D) estão presentes no gene DSCAM como séries de éxons alternativos. Cada mRNA maduro contém 1 de 12 alternativas para o éxon A (*vermelho*), 1 de 48 alternativas para o éxon B (*verde*), 1 de 33 alternativas para o éxon C (*azul*), 1 de 2 alternativas para o éxon D (*amarelo*) e todos os éxons invariáveis (*cinza*). Se todas as combinações de *splicing* possíveis fossem usadas, 38.016 proteínas diferentes poderiam em princípio ser produzidas a partir do gene Dscam. Somente um dos muitos possíveis padrões de *splicing* (indicado pela linha *magenta)* e mRNA maduro que ele produz estão indicados. (Adaptada de D.L. Black, *Cell* 103:367-370, 2000. Com permissão de Elsevier)

conjunto. No fim, entretanto, a forma geral do objeto final é determinada pelas instruções que indicam como os componentes são colocados juntos.

Em grande parte, as instruções necessárias para produzir um animal multicelular estão contidas no DNA regulatório não codificante que está associado a cada gene. Como discutido no Capítulo 8, esse DNA contém, distribuído dentro dele, dúzias de elementos regulatórios separados – segmentos de DNA pequenos que servem como sítios de ligação para proteínas de ligação gênica específicas. Pode-se dizer que esse DNA regulatório define o programa sequencial de desenvolvimento: as regras que as células seguem enquanto proliferam, acessando as suas posições no embrião e consequentemente ativando novos conjuntos de genes.

Embora a comparação entre muitas diferentes espécies seja uma maneira poderosa de identificar sequências regulatórias chave em um grande excesso de DNA sem importância, ainda não sabemos como ler essas sequências adequadamente. Por exemplo, diferentes reguladores transcricionais irão ligar-se ao mesmo pedaço de DNA, então se sabe que a sequência não é suficiente para especificar se tal proteína ou proteínas poderiam realmente regular um gene. Além disso, o fato de o controle da expressão gênica ocorrer de maneiras complexas e combinatórias (ver Figura 8-12) complica as nossas tentativas de decifrar quando, no desenvolvimento, e em qual tipo de célula cada gene é expresso.

Outro desafio na interpretação da informação codificada no genoma humano vem da prevalência do *splicing* alternativo. Sabemos que a maioria dos genes humanos sofre *splicings* alternativos, permitindo que as células produzam uma série de proteínas relacionadas, porém distintas, a partir de um único gene (ver Figura 7-21). Frequentemente, esse *splicing* é regulado de maneira que uma forma da proteína é produzida em um tipo de tecido, e outras formas são produzidas preferencialmente em outros tecidos. Em um caso extremo, de *Drosophila,* um único gene pode produzir em torno de 38.000 variantes proteicas diferentes por meio do *splicing* alternativo (**Figura 9-32**). Assim, um organismo pode produzir muito mais produtos proteicos do que possui genes. Ainda não sabemos o suficiente a respeito da biologia do *splicing* alternativo para prever exatamente quais genes humanos estão sujeitos a esse processo e quando e onde durante o desenvolvimento tal regulação poderia ocorrer. Entretanto, parece que o *splicing* alternativo é especialmente prevalente no desenvolvimento do cérebro.

Uma outra incerteza na interpretação do genoma humano diz respeito ao preciso papel dos micro RNAs (ver p. 290-291). Descobertos há pouco tempo, esses pequenos RNAs regulam um terço de todos os genes humanos, e poucos deles têm sido estudados com algum detalhe. Finalmente, embora uma estimativa de que 1,5% do genoma humano codifique para proteínas, mais 3,5% dele é altamente conservado quando comparado com o genoma de outro vertebrado – o que se presume ser importante (ver p. 312). Alguns desses DNAs conservados produzem moléculas de RNA de função conhecida e algumas proteínas regulatórias; o restante permance um mistério.

O corpo humano é formado como o resultado de sequências complexas de decisões que as células tomam enquanto proliferam e se especializam durante o

nosso desenvolvimento: quais moléculas de RNA e quais proteínas devem ser feitas em determinado local e quando e quanto de cada uma deve ser produzida. A informação para todas essas decisões está contida dentro da sequência genômica humana, mas ainda não sabemos como ler esse tipo de código. Decifrar essa informação é um dos grandes desafios para a próxima geração de biólogos celulares.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- **Pela comparação das sequências nucleotídicas ou de aminoácidos de organismos contemporâneos, estamos começando a reconstruir como os genomas têm evoluído nos bilhões de anos que têm se passado desde o aparecimento das primeiras células.**
- **A variação genética – a matéria-prima para as alterações evolutivas – ocorre por uma variedade de mecanismos que alteram as sequências nucleotídicas dos genomas. Essas alterações partem de mutações pontuais simples a duplicações em grande escala ou rearranjos.**
- **Alterações genéticas que ofereçam aos organismos uma vantagem seletiva ou aquelas que são seletivamente neutras são as mais prováveis de serem perpetuadas. Alterações que comprometam seriamente a adaptabilidade de um organismo são eliminadas por meio da seleção natural.**
- **A duplicação gênica é uma das mais importantes fontes de diversidade genética. Uma vez que um gene tenha sido duplicado, as duas cópias podem acumular diferentes mutações e tornar-se especializadas em desempenhar funções diferentes. Rodadas repetidas desse tipo de duplicação e divergência, através do tempo evolutivo, podem resultar na criação de grandes famílias gênicas.**
- **Acredita-se que a evolução de novas proteínas tenha sido facilitada pela permuta de éxons entre genes para criar proteínas híbridas com novas funções.**
- **O genoma humano contém $3{,}2 \times 10^9$ pares de nucleotídeos divididos entre 22 cromossomos autossomos e 2 cromossomos sexuais. Somente uma pequena porcentagem do DNA codifica para proteínas ou RNAs estruturais, regulatórios ou catalíticos.**
- **Indivíduos humanos diferem um do outro por uma média de 1 par de nucleotídeos em cada 1.000; essa variação dá suporte à nossa individualidade e fornece a base para a identificação de indivíduos pela análise de DNA.**
- **A comparação de sequências genômicas de diferentes espécies fornece uma ferramenta importante para a identificação de genes, assim como sequências regulatórias funcionalmente importantes.**
- **Visto que espécies relacionadas (como humanos e camundongos) compartilham muitos genes em comum, alterações evolutivas que afetam como esses genes são regulados são especialmente importantes no entendimento de diferenças entre espécies.**

TERMOS-CHAVE

sintenia conservada
divergência
embaralhamento de éxons
célula germinativa
linhagem germinativa
duplicação gênica e divergência
gene homólogo
transferência horizontal de genes
fase aberta de leitura (ORF)
árvore filogenética
ponto de mutação
seleção purificadora
polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)
célula somática

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 9-6

Discuta a seguinte afirmação: "Os elementos genéticos móveis são parasitas. Eles são danosos ao organismo hospedeiro e, dessa forma, o colocam em desvantagem evolutiva".

QUESTÃO 9-7

O Cromossomo 22 (48 Mb de comprimento) possui cerca de 700 genes que codificam proteínas, com 19.000 pares de nucleotídeos de comprimento em média e contendo em média 5,4 éxons, cada um dos quais em média com 266 pares de nucleotídeos. Na média, qual fração de um gene que codifica uma proteína é convertida em mRNA? Qual fração do cromossomo os genes ocupam?

QUESTÃO 9-8

(Verdadeiro/Falso) Acredita-se que a maioria do DNA humano seja lixo sem importância. Explique a sua resposta.

QUESTÃO 9-9

Elementos genéticos móveis compõem quase metade do genoma humano. Entretanto, em alguns pontos, esses elementos são raros, como ilustrado para o conjunto de genes denominado HoxD, no Cromossomo 2 (**Figura Q9-9**). Esse conjunto apresenta em torno de 100 kb em comprimento e contém nove genes, cuja expressão diferencial ao longo do eixo anteroposterior do embrião em desenvolvimento estabelece o plano corporal básico para humanos (e para outros animais). Por que você suporia que os elementos genéticos móveis são tão raros nesse conjunto? Na Figura Q9-9, as linhas que se projetam para *cima* indicam éxons de genes conhecidos. As linhas que se projetam para *baixo* indicam elementos genéticos móveis; eles são tão numerosos que se fundem em um bloco sólido fora do conjunto Hox. Para comparação, é mostrada uma região equivalente do Cromossomo 22.

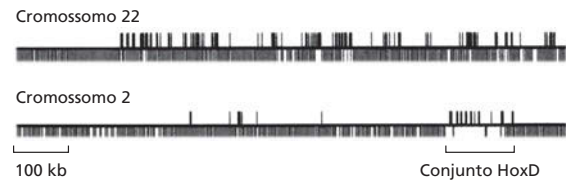



Figura Q9-9

QUESTÃO 9-10

O primeiro método gráfico para comparar sequências nucleotídicas – o programa denominado *diagon plot* – ainda produz uma das melhores comparações visuais de relacionamento de sequências. Um exemplo está ilustrado na **Figura Q9-10**, onde o gene da β-globina humana é comparado ao cDNA humano para β-globina (a qual contém somente a porção codificante do gene; Figura Q9-10A) e ao gene da β-globina de camundongo (Figura Q9-10B). *Diagon plots* são gerados pela comparação de blocos de sequências; nesse caso, blocos de 11 nucleotídeos de cada vez. Se 9 ou mais dos nucleotídeos corresponderem, um ponto é colocado no diagrama nas coordenadas correspondendo aos blocos que estão sendo comparados. Uma comparação de todos os possíveis blocos gera diagramas como aqueles mostrados na Figura Q9-10, na qual as homologias de sequência são mostradas como linhas diagonais.

A. A partir da comparação do gene da β-globina humana com o cDNA da β-globina humana (Figura Q9-10A), você pode deduzir as posições dos éxons e íntrons no gene da β-globina?

B. Os éxons inteiros do gene da β-globina humana (indicados pelo sombreamento na Figura Q9-10B) são homólogos ao gene da β-globina de camundongo? Identifique e explique quaisquer diferenças-chave.

C. Existe alguma homologia entre os genes da β-globina humana e da de camundongo que se localizem fora dos éxons? Se houver, identifique a sua localização e ofereça uma explicação para a sua preservação durante a evolução.

D. Algum dos genes sofreu alterações no tamanho de íntrons durante a sua divergência evolutiva? Como você pode saber?

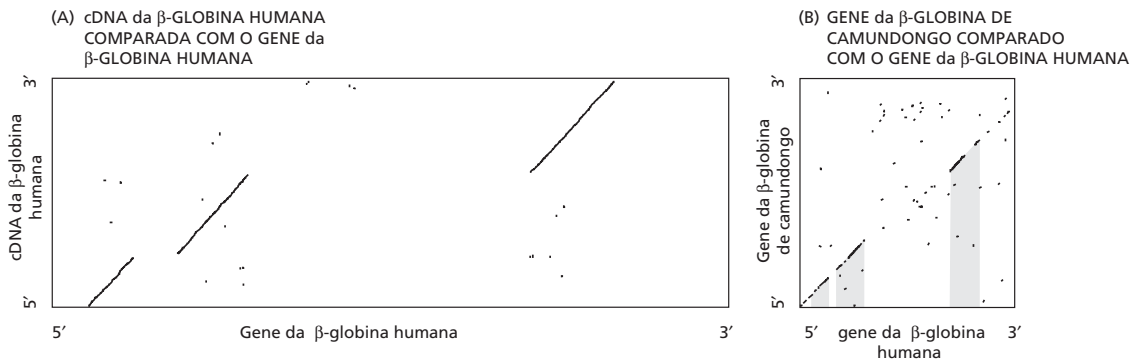



Figura Q9-9

QUESTÃO 9-11

Sua orientadora, uma brilhante bioinformata, possui grande confiança em seu intelecto e diligência. Ela sugere que você escreva um programa de computador que irá identificar os éxons dos genes que codificam proteínas diretamente da sequência do genoma humano. Na preparação para a tarefa, você decide listar as características que deveriam distinguir as sequências codificantes do DNA intrônico e sequências fora dos genes. Quais características você listaria? (Você pode revisar os aspectos básicos da expressão gênica no Capítulo 7.)

QUESTÃO 9-12

Por que você esperaria encontrar um códon de parada a cada 20 códons ou mais em uma sequência ao acaso de DNA?

QUESTÃO 9-13

O código genético (ver Figura 7-24) relaciona a sequência de nucleotídeos do mRNA à sequência de aminoácidos das proteínas codificadas. Desde que o código foi decifrado, alguns conclamaram que ele deveria ser um acidente estático, isto é, o sistema aleatoriamente caiu em um lugar em algum organismo ancestral e foi perpetuado inalterado ao longo da evolução; outros têm questionado que o código havia sido moldado pela seleção natural.

Uma característica surpreendente do código genético é a sua inerente resistência aos efeitos de mutação. Por exemplo, uma mudança na terceira posição de um códon frequentemente especifica para o mesmo aminoácido ou um com propriedades químicas semelhantes. Contudo, esse código natural é mais resistente a mutações do que outras versões possíveis? A resposta é um enfático “Sim”, como ilustrado na **Figura Q9-13**. Somente um em um milhão de códigos gerados ao acaso por computador é mais resistente a erros do que o código genético natural.

A resistência a mutações do código genético sinaliza em favor da sua origem como derivada de um acidente imobilizado ou como resultado de seleção natural? Explique o seu raciocínio.

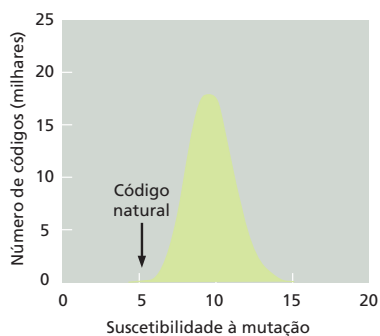



Figura Q9-13

QUESTÃO 9-14

Qual dos processos listados a seguir NÃO se acredita contribuir significantemente para a evolução de novas proteínas codificadas por genes?

A. Duplicação de genes para criar cópias extras que podem adquirir novas funções.

B. Formação de genes novos *de novo* a partir de DNA não codificante no genoma.

C. Transferência horizontal de DNA entre células de diferentes espécies.

D. Mutação de genes existentes para criar novas funções.

E. Embaralhamento de domínios de genes por rearranjos gênicos.

		Taxas de mutação	
Gene	Aminoácidos	Não sinônimas	Sinônimas
Histona H3	135	0,0	4,5
α-Hemoglobina	141	0,6	4,4
Interferon γ	136	3,1	5,5

As taxas foram determinadas comparando sequências humanas e de ratos e são expressas como trocas de nucleotídeos por sítio por 10^9 anos. A taxa média de mudanças não sinônimas para várias dezenas de ratos e os genes humanos é de cerca de 0,8.

QUESTÃO 9-15

Alguns genes evoluem mais rapidamente do que outros, mas como isso pode ser demonstrado? Uma metodologia é comparar vários genes das mesmas duas espécies, como mostrado para ratos e humanos na tabela da Questão 9-14. Duas medidas de taxas de substituição nucleotídica estão indicadas na tabela. Alterações não sinônimas se referem a alterações em nucleotídeos únicos na sequência de DNA que alteram o aminoácido codificado (ATC → TTC, o qual origina isoleucina → fenilalanina, por exemplo). Alterações sinônimas se referem àquelas que não alteram o aminoácido codificado (ATC → ATT, a qual origina isoleucina → isoleucina, por exemplo). (Como pode ser visto no código genético, Figura 7-24, existem muitos casos onde vários códons correspondem ao mesmo aminoácido.)

A. Por que existem diferenças tão grandes entre as taxas sinônimas e não sinônimas de substituição nucleotídica?

B. Considerando que as taxas de alterações sinônimas são aproximadamente as mesmas para todos os três genes, como é possível para o gene da histona H3 resistir tão efetivamente às alterações nucleotídicas que alteram a sequência de aminoácidos?

C. Em princípio, uma proteína poderia ser altamente conservada porque ela existe em um sítio “privilegiado” no genoma que é sujeito a taxas muito pequenas de mutação. Qual característica dos dados na tabela depõe contra essa possibilidade para a proteína histona H3?

QUESTÃO 9-16

Hemoglobinas de plantas foram encontradas inicialmente em legumes, onde elas funcionam nos nódulos das raízes para baixar a concentração de oxigênio de maneira que as bactérias residentes possam fixar nitrogênio. Essas hemoglobinas conferem uma cor rosácea característica aos nódulos das raízes. A descoberta

da hemoglobina em plantas foi inicialmente surpreendente por ser encontrado um gene típico de sangue animal. Foi desenvolvida a hipótese de que o gene vegetal foi adquirido pela transferência horizontal a partir de algum animal. Muitos outros genes de hemoglobina têm sido agora sequenciados, e uma árvore filogenética das hemoglobinas é mostrada na **Figura Q9-16**.

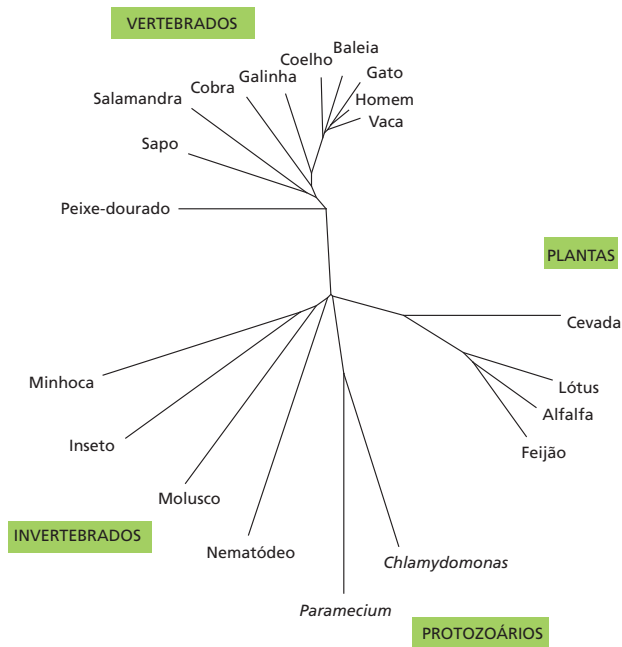
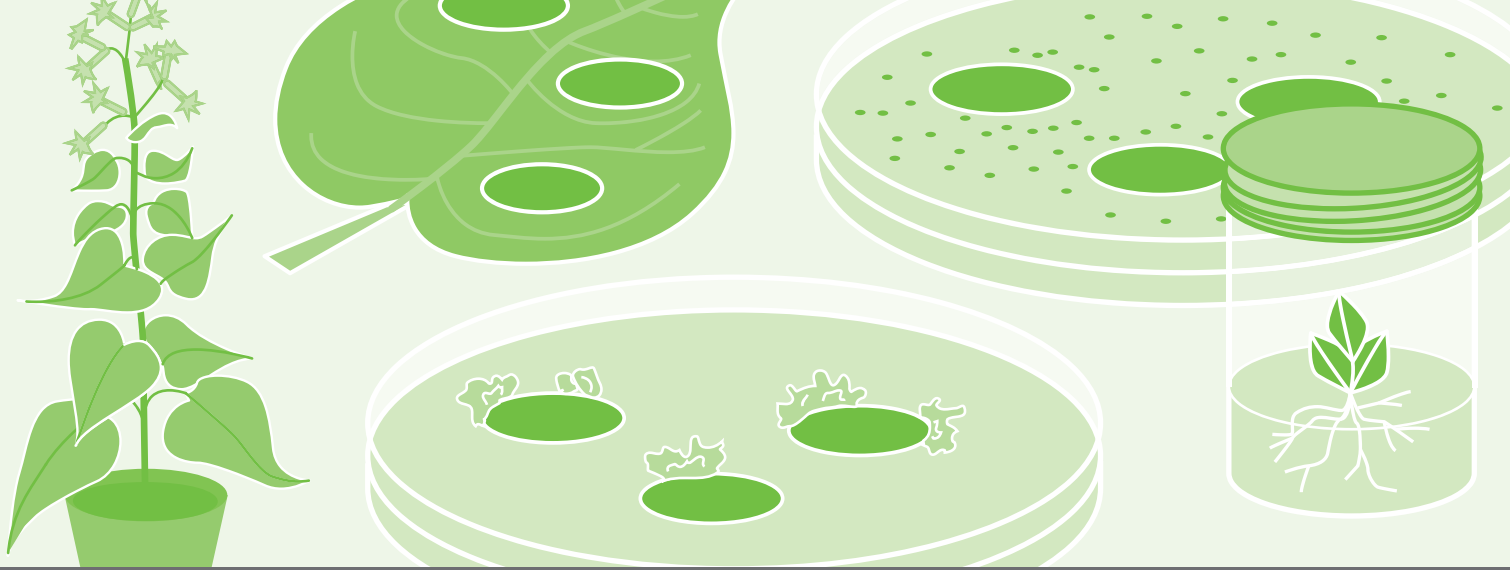



Figura Q9-16

A. A evidência dessa árvore reforça ou refuta a hipótese de que as hemoglobinas vegetais surgiram por transferência horizontal de genes?

B. Supondo que os genes de hemoglobinas vegetais foram originalmente derivados por transferência horizontal (de um nematoide parasita, por exemplo); com o que você esperaria que a árvore filogenética se parecesse?

QUESTÃO 9-17

A fidelidade da replicação do DNA é tal que em média somente em torno de 0,6 em 6 bilhões de nucleotídeos em uma célula germinativa humana é alterado em cada divisão celular. Como a maioria de nosso DNA não está sujeita a qualquer restrição precisa em sua sequência, a maioria dessas alterações é seletivamente neutra. Quaisquer dois humanos modernos escolhidos ao acaso irão mostrar em torno de 1 diferença de sequência nucleotídica a cada 1.000 nucleotídeos. Suponha que sejamos todos descendentes de um único par de ancestrais – Adão e Eva – que eram geneticamente idênticos e homozigotos (cada cromossomo era idêntico ao seu homólogo). Assumindo que todas as mutações da linhagem germinativa originadas são preservadas em seus descendentes, quantas gerações celulares devem ter decorrido desde os tempos de Adão e Eva para 1 diferença por 1.000 nucleotídeos nos descendentes modernos? Assumindo que cada geração humana corresponda a uma média de 200 ciclos de divisões celulares na linhagem de células germinativas e considerando-se 30 anos por geração humana, há quantos anos teria esse casal ancestral vivido?

CAPÍTULO 10

Análise de Genes e Genomas

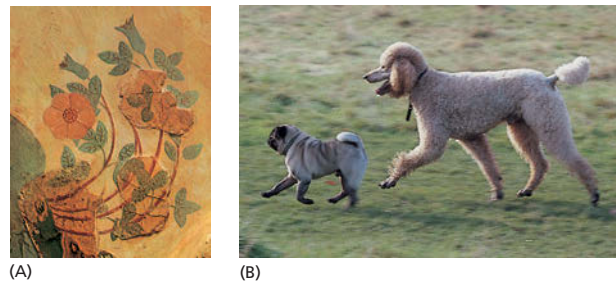
O século XXI promete ser um momento excitante para a biologia celular. Novos métodos para analisar e manipular DNA, RNA e proteínas estão abastecendo uma explosão de informações e permitindo que estudemos genes e células de maneiras nunca imaginadas antes. Agora temos acesso às sequências de vários bilhões de nucleotídeos, fornecendo os projetos moleculares para dúzias de organismos – desde micróbios e plantas até aves, insetos, humanos e outros mamíferos. E novas técnicas poderosas estão nos ajudando a decifrar essa informação, permitindo-nos não apenas compilar imensos catálogos detalhados de genes e proteínas, mas também começar a resolver como esses componentes funcionam juntos para formar células, tecidos e organismos funcionais. O objetivo é simplesmente a obtenção do completo entendimento do processo que ocorre, a cada momento, dentro dos seres vivos.

Essa revolução tecnológica tem sido potencializada, em grande parte, pelo desenvolvimento de métodos que têm aumentado muito a nossa capacidade de manipular o DNA. No início da década de 1970, tornou-se possível, pela primeira vez, isolar um dado pedaço de DNA a partir de vários milhões de pares de nucleotídeos em um cromossomo típico. Isso, por sua vez, possibilitou gerar novas moléculas de DNA no tubo de ensaio e introduzir esse material genético feito sob encomenda de volta nos organismos vivos. Esses progressos, chamados de **tecnologia do DNA recombinante** ou engenharia genética, tornaram possível criar cromossomos com combinações de genes que nunca seriam formadas naturalmente – ou combinações concebíveis que poderiam ocorrer na natureza, mas poderiam levar milhares de anos de eventos casuais para serem reunidas.

É claro que humanos têm feito experiências com DNA, sem se darem conta, por milênios. Variedades modernas de rosas de jardins, por exemplo, são os produtos de séculos de cruzamento seletivo entre linhagens de rosas selvagens da China e da Europa (**Figura 10-1A**). Similarmente, a enorme variação de tamanhos, cores e formas e até mesmo de comportamento de diferentes raças de cães é o resultado de experimentos de cruzamentos intencionais

(A)

(B)

Figura 10-1 Humanos têm feito experimentos com DNA por milênios. (A) O desenho mais antigo conhecido de uma rosa na arte ocidental, do palácio de Knossos em Creta, de aproximadamente 2000 a.C. As rosas modernas são o resultado de séculos de cruzamentos entre essas rosas selvagens. (B) Um poodle e um pug ilustram a variedade de raças de cães. Todos os cães, indiferentemente da raça, pertencem a uma única espécie. (B, cortesia de Heather Angel.)

– com seleção para a característica desejada – realizados desde que o lobo cinzento, o ancestral do cão moderno, foi domesticado há cerca de 10.000-15.000 anos (Figura 10-1B).

Técnicas modernas de engenharia genética, entretanto, nos permitem alterar o DNA com precisão e velocidade muito maiores. Com os equipamentos e as técnicas mais modernas, até mesmo um estudante principiante pode coletar o material genético de um organismo, isolar uma região de DNA que contém um gene específico, produzir um número praticamente ilimitado de cópias exatas desse DNA e determinar a sua sequência de nucleotídeos com certa facilidade. Utilizando variações dessas técnicas, o gene isolado pode ser alterado (ou redesenhado) no laboratório e então transferido de volta para células em cultura para elucidar a sua função. Com métodos um pouco mais sofisticados, os genes modificados podem ser inseridos em animais e plantas, de modo que eles se tornem uma parte funcional do genoma do organismo que possa ser herdada.

Essas técnicas inovadoras têm causado um forte impacto sobre todos os aspectos da biologia celular. Elas tornaram possível a nossa compreensão atual sobre a organização e a história evolucionária dos genomas complexos dos eucariotos (como discutido no Capítulo 9) e levaram à descoberta de inteiras novas classes de genes, RNAs e proteínas. Essas técnicas forneceram novos meios para determinar as funções das proteínas e dos domínios individuais dentro das proteínas, revelando uma série de relações inesperadas entre eles. Elas também proporcionaram aos biólogos um importante conjunto de ferramentas para resolver os mecanismos pelos quais um animal ou vegetal completo pode desenvolver-se a partir de uma única célula.

A tecnologia do DNA recombinante também teve uma profunda influência sobre vários aspectos da vida humana fora da pesquisa científica: ela é utilizada para detectar as mutações no DNA que são responsáveis por doenças hereditárias e para diagnosticar uma predisposição individual a doenças genéticas, como o câncer; ela é utilizada na ciência forense para identificar ou absolver possíveis suspeitos de um crime; ela é utilizada para produzir um crescente número de produtos farmacêuticos humanos, incluindo insulina para diabéticos e a proteína da coagulação do sangue, Fator VIII, para hemofílicos. Até nossos detergentes para lavar roupas, os quais contêm proteases termoestáveis que digerem alimentos derramados e manchas de sangue, utilizam produtos da tecnologia do DNA. De todas as descobertas descritas neste livro, aquelas que levam ao desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante são provavelmente as de maior impacto no dia a dia de nossas vidas.

Neste capítulo, descreveremos os métodos mais comuns para manipular os genes e determinar sua função. Primeiro, analisaremos os principais métodos do campo revolucionário da tecnologia do DNA recombinante iniciando com uma discussão sobre as técnicas básicas de análise de DNA. Depois, descreveremos como as sequências de DNA podem ser isoladas e produzidas em grandes números pelas técnicas de *clonagem de DNA* e *reação em cadeia da polimerase* (*PCR – polimerase chain reaction*) e explicaremos como essas sequências podem ser utilizadas para produzir e estudar proteínas. Na última parte do capítulo, analisaremos como a tecnologia de DNA é utilizada para

QUESTÃO 10-1

O sequenciamento de DNA dos seus próprios genes para β-globina (um a partir de cada dos seus dois Cromossomos 11) revelou uma mutação em um dos genes. Com apenas essa informação, o quanto você deveria se preocupar sobre ser um portador de uma doença hereditária que pode ser passada adiante para seus filhos? Que outra informação você gostaria de ter para estimar o seu risco?

descobrir os papéis de genes e proteínas individuais nas células e nos organismos. Juntas, essas técnicas tornaram possível a nossa compreensão atual sobre a biologia, incluindo grande parte do material apresentado entre as capas deste livro.

MANIPULANDO E ANALISANDO MOLÉCULAS DE DNA

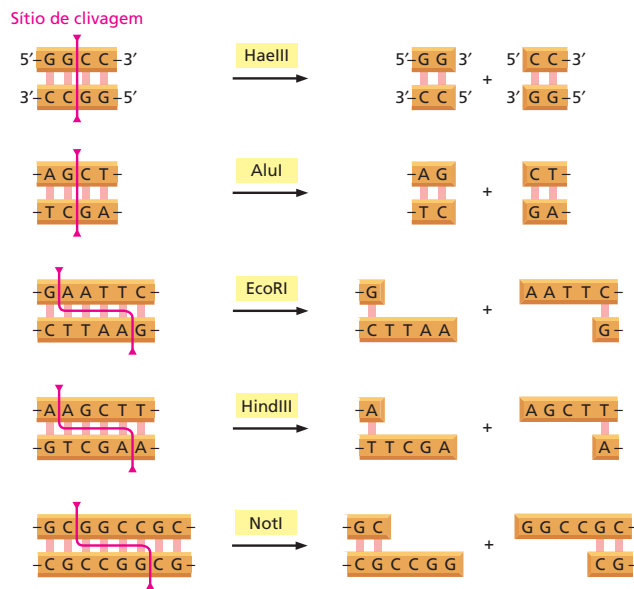
Até o desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante, indícios cruciais para entender como as células trabalham permaneceram encerrados no genoma. Uma vez que os cientistas constataram que a informação genética estava codificada na sequência de nucleotídeos no DNA, eles tiveram de colocar as mãos em genes individuais para descobrir como esses se parecem e determinar como eles funcionam. Antes da revolução na tecnologia de DNA que ocorreu na década de 1970, essa tarefa era quase impossível. Parte do problema era que o isolamento de um único gene não era algo trivial. Diferentemente de uma proteína, um gene não existe como uma entidade discreta nas células, mas sim como parte de uma molécula de DNA muito maior. Até mesmo genomas de bactérias, que são muito menos complexos do que os cromossomos de eucariotos, são muito longos. O genoma de *E. coli,* por exemplo, contém 4,6 milhões de nucleotídeos.

Grandes pedaços de DNA podem ser quebrados em pequenos pedaços por tesoura mecânica; entretanto, o fragmento contendo um determinado gene ainda será apenas um entre uma centena de milhares ou mais fragmentos de DNA que seriam obtidos, por exemplo, a partir de um genoma de mamífero, por esses meios. Em uma amostra contendo várias cópias idênticas da mesma molécula grande de DNA, cada molécula seria quebrada diferentemente pela tesoura, produzindo um grupo confuso de fragmentos aleatórios. Como então um gene pode ser isolado e identificado?

A solução para esse problema surgiu, em grande parte, com a descoberta de uma classe de enzimas bacterianas conhecidas como *nucleases de restrição.* Uma nuclease catalisa a hidrólise de uma ligação fosfodiéster em um ácido nucleico. Contudo, essas enzimas têm uma propriedade que é distinta de outras nucleases: elas cortam o DNA de fita dupla apenas em um sítio específico, determinado por uma sequência curta de pares de nucleotídeos. As nucleases de restrição podem, assim, ser utilizadas para produzir um grupo reproduzível de fragmentos de DNA específicos a partir de qualquer genoma. Iniciaremos esta seção descrevendo como essas enzimas trabalham e como os fragmentos de DNA produzidos por elas podem ser separados uns dos outros. Então, discutiremos como esses fragmentos podem ser sondados para identificar aqueles que contêm o DNA de interesse.

As nucleases de restrição cortam moléculas de DNA em sítios específicos

Como a maioria das ferramentas da tecnologia de DNA, as nucleases de restrição foram descobertas por pesquisadores que estavam estudando um problema biológico especializado que prendeu o seu interesse. Foi observado que certas bactérias sempre degradavam DNA "estranho" que era introduzido nelas experimentalmente. Uma procura pela causa dessa degradação direcionada revelou uma nova classe de nucleases, presente dentro da bactéria hospedeira, que cliva o DNA apenas em certas sequências nucleotídicas. O próprio DNA bacteriano é protegido da clivagem pela modificação química dessas mesmas sequências. Como essas enzimas restringiam a transferência de DNA entre certas cepas de bactérias, o nome **nuclease de restrição** foi dado a elas. Essa solução para um problema aparentemente misterioso na biologia da bactéria mudou para sempre a maneira na qual os biólogos celulares e moleculares estudam a vida.

Figura 10-2 **Nucleases de restrição clivam DNA em sequências nucleotídicas específicas.** Frequentemente, as sequências-alvo são palindrômicas (isto é, a sequência nucleotídica é simétrica em torno de um ponto central). Nesses exemplos, ambas as fitas de DNA são cortadas em pontos específicos dentro da sequência-alvo. Algumas enzimas, como HaeIII e AluI, cortam diretamente através da dupla-hélice de DNA e deixam duas moléculas de DNA com extremidades cegas; para outras, como EcoRI, NotI e HindIII, os cortes em cada extremidade são assimétricos. Esses cortes assimétricos geram "extremidades coesivas", curtas, projeções de fita simples que ajudam as moléculas cortadas a se unirem pelo pareamento das bases complementares. Essa nova união das moléculas de DNA se torna importante para a clonagem de DNA, como discutiremos mais adiante neste capítulo. As nucleases de restrição são normalmente obtidas a partir de bactérias, e seus nomes refletem as suas origens: por exemplo, a enzima EcoRI vem de *Escherichia coli.*

Diferentes espécies de bactérias contêm diferentes nucleases de restrição, cada uma cortando em uma sequência de nucleotídeos específica diferente (**Figura 10-2**). Como essas suas sequências-alvo são curtas – geralmente 4-8 pares de nucleotídeos –, sítios de clivagem ocorrerão, meramente por acaso, em qualquer molécula longa de DNA. Por isso, nucleases de restrição podem ser utilizadas em DNA de qualquer fonte. A principal razão para que elas sejam tão úteis é que uma dada enzima sempre cortará uma dada molécula de DNA nos mesmos sítios. Dessa forma, para uma amostra de DNA humano, o tratamento com uma determinada nuclease de restrição sempre produzirá a mesma coleção de fragmentos de DNA. Atualmente, as nucleases de restrição são vendidas por várias companhias e são encomendadas pelo correio; um catálogo *on line* lista centenas dessas enzimas, cada uma capaz de cortar uma sequência diferente de DNA.

As sequências-alvo das nucleases de restrição variam na frequência na qual elas ocorrem no DNA. Como mostrado na Figura 10-2, a enzima HaeIII corta em uma sequência de quatro pares de nucleotídeos; seria esperado que essa sequência ocorresse só por acaso aproximadamente uma vez a cada 256 pares de nucleotídeos (1 em 4^4). Por um raciocínio similar, seria esperado que a enzima NotI, que tem uma sequência-alvo de oito nucleotídeos, clivasse o DNA em média de uma vez a cada 65.536 pares de nucleotídeos (1 em 4^8). Por esse motivo, os tamanhos médios dos fragmentos de DNA produzidos por diferentes nucleases de restrição podem ser muito diferentes. Essas características tornam possível clivar uma longa molécula de DNA em tamanhos de fragmentos que são mais adequados para uma determinada aplicação.

A eletroforese em gel separa fragmentos de DNA de diferentes tamanhos

Depois que uma grande molécula de DNA é clivada em pequenos pedaços com uma nuclease de restrição, normalmente se deseja separar os fragmentos de DNA uns dos outros. Isso em geral é obtido utilizando eletroforese em gel, que separa os fragmentos com base no seu comprimento. A mistura de fragmentos de DNA é aplicada em uma das extremidades de um bloco de gel de agarose ou de poliacrilamida, que contém uma rede microscópica de poros. Uma voltagem é, então, aplicada através do bloco de gel. Como o DNA tem carga negativa, os fragmentos migram em direção do eletrodo positivo; os fragmentos maiores mi-

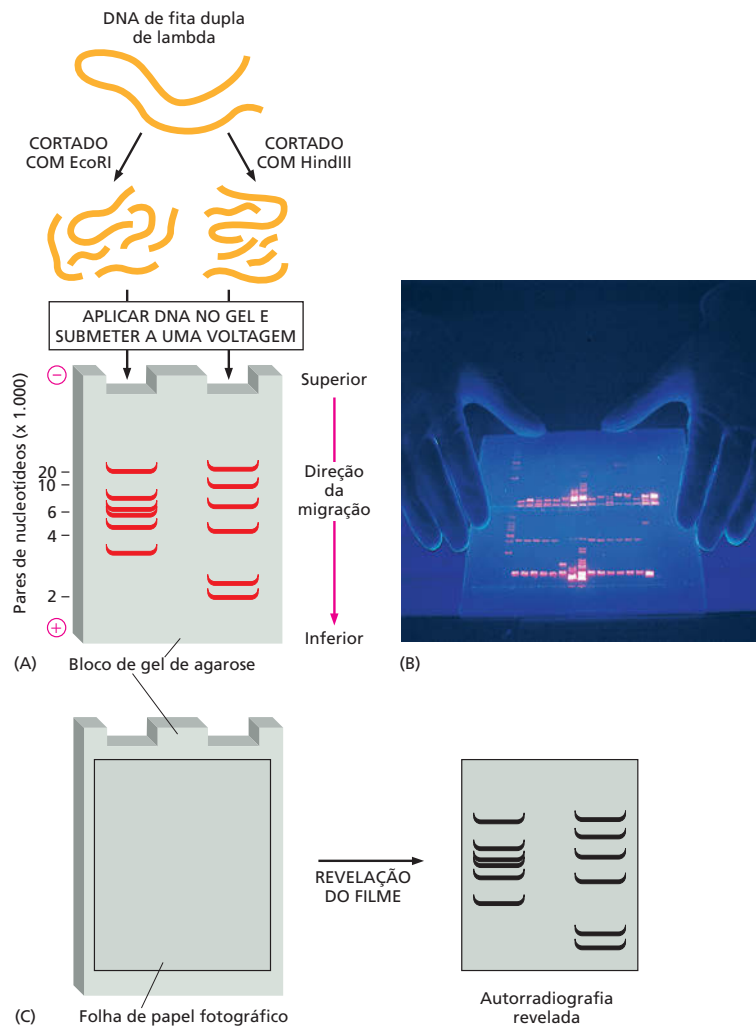



Figura 10-3 Moléculas de DNA podem ser separadas por tamanho utilizando eletroforese em gel. (A) Essa ilustração esquemática compara os resultados do corte da mesma molécula de DNA (nesse caso, o genoma de um vírus que infecta bactérias, chamado de lambda) com duas nucleases de restrição diferentes: EcoRI *(esquerda)* e HindIII *(direita)*. Os fragmentos são, então, separados por eletroforese em gel. Como fragmentos maiores migram mais lentamente do que os menores, as bandas mais inferiores no gel contêm os menores fragmentos de DNA. (B) Para visualizar as bandas de DNA, o gel é imerso em um corante – como o brometo de etídeo – que se liga ao DNA e fluoresce sob luz ultravioleta. (C) Um método alternativo para visualizar as bandas de DNA é a autorradiografia. Antes da clivagem com enzimas de restrição, o DNA pode ser "marcado" com o radioisótopo ^{32}P pela substituição do ^{32}P por algum dos átomos não radioativos de fósforo. Isso poderia ser feito, por exemplo, replicando o vírus lambda na presença de ^{32}P. Como as partículas β emitidas a partir do ^{32}P irão expor o filme fotográfico, uma folha de filme colocada sobre o gel de agarose mostrará, quando revelada, a posição de todas as bandas de DNA. (B, cortesia de Science Photo Library.)

gram mais lentamente porque o seu progresso é mais impedido pela matriz de agarose. Após algumas horas, os fragmentos de DNA ficam espalhados ao longo do gel de acordo com o tamanho, formando uma escada de bandas discretas, cada uma composta de uma coleção de moléculas de DNA de comprimentos idênticos (**Figura 10-3A**). Isolar fisicamente um determinado fragmento de DNA desse pedaço de agarose é razoavelmente simples: uma pequena parte do gel que contém a banda pode ser cortada usando uma lâmina de bisturi ou uma gilete, e o DNA pode então ser extraído.

As bandas de DNA em um gel de agarose ou de poliacrilamida são invisíveis, a não ser que o DNA seja marcado ou corado de alguma maneira. Um método sensível de corar DNA é expô-lo a um corante que fluoresce sob luz ultravioleta quando está ligado ao DNA (Figura 10-3B). Um método de detecção ainda mais sensível envolve a incorporação de um radioisótopo nas moléculas de DNA antes da eletroforese; ^{32}P é frequentemente utilizado, já que pode ser incorporado nos fosfatos do DNA e emite uma partícula β energética que é facilmente detectada pela técnica de autorradiografia (Figura 10-3C).

QUESTÃO 10-2

Que produtos são produzidos quando o pedaço de DNA de fita dupla à esquerda é digerido com (A) EcoRI, (B) AluI, (C) NotI ou (D) essas três enzimas juntas? (Ver Figura 10-2 para as sequências-alvo dessas enzimas.)

5′-AAGAATTGCGGAATTCGAGCTTAAGGGCCGCGCCGAAGCTTTAAA-3′
3′-TTCTTAACGCCTTAAGCTCGAATTCCCGGCGCGGCTTCGAAATTT-5′

A hibridização fornece um meio sensível de detectar sequências nucleotídicas específicas

A exposição de um gel a um corante fluorescente que se liga ao DNA – ou a marcação de DNA com ^{32}P – permitirá que cada banda no gel seja visualizada. Entretanto, não revela qual das bandas contém o segmento de DNA de interesse. Para identificar o fragmento que possui a sequencia de nucleotídeos de interesse, pode-se tomar vantagem do fato de que qualquer fita simples de DNA formará pares de bases de Watson-Crick com uma segunda fita de sequência de nucleotídeos complementar.

Sob condições normais, as duas fitas de uma dupla-hélice de DNA são mantidas unidas por ligações de hidrogênio que podem ser quebradas pelo aquecimento do DNA até cerca de 90 °C ou submetendo-o a pHs extremos. Esses tratamentos separam as duas fitas, uma da outra, mas não quebram as ligações covalentes que unem os nucleotídeos dentro de cada fita. Se esse processo é revertido lentamente (isto é, baixando lentamente a temperatura para a temperatura normal do corpo ou trazendo o pH de volta para a neutralidade), as fitas complementares irão prontamente refazer as duplas-hélices. Esse processo é chamado de **hibridização**, ou *renaturação,* e resulta de um restabelecimento das ligações de hidrogênio complementares (Figura 10-4).

Uma reação de hibridização similar ocorrerá entre quaisquer duas cadeias de ácidos nucleicos de fita simples (DNA/DNA, RNA/RNA ou RNA/DNA), contanto que contenham sequências de nucleotídeos complementares. A capacidade fundamental de uma molécula de ácido nucleico de fita simples formar uma dupla-hélice apenas com uma molécula complementar a ela fornece uma potente técnica para detectar sequências nucleotídicas específicas, tanto no DNA como no RNA.

A hibridização é realizada pela utilização de sondas de DNA desenhadas para reconhecer uma sequência de nucleotídeos desejada

Entretanto, para procurar por uma sequência de nucleotídeos por hibridização, primeiro é preciso um pedaço de ácido nucleico com o qual procurar. Essa *sonda de DNA* é uma molécula de DNA de fita simples, normalmente com 10-1.000 nucleotídeos de comprimento, que é utilizada nas reações de hibridização para detectar moléculas de ácidos nucleicos que contenham uma sequência complementar. Atualmente, sondas de DNA de qualquer sequência desejada podem ser sintetizadas sem o uso de enzimas. Máquinas do tamanho de um forno de micro-ondas podem ser programadas para unir nucleotídeos por síntese química para produzir cadeias de DNA de fita simples de qualquer sequência de até várias centenas de nucleotídeos de comprimento.

Para saber qual sequência sintetizar, precisamos conhecer a sequência de nucleotídeos do fragmento de DNA de interesse. Digamos, por exemplo, que gostaríamos de identificar um fragmento de DNA que contém uma porção do gene da β-globina. Como a sequência desse gene é conhecida, produzir uma sonda que a reconhecerá é um exercício direto em localizar a sequência em uma base de dados e então programar o sintetizador de ácidos nucleicos. Atualmente, tais sondas normalmente são encomendadas para empresas que realizam a síntese de pedaços de DNA solicitados pelos clientes. É só enviar um e-mail contendo

Figura 10-4 Uma molécula de DNA pode sofrer desnaturação e renaturação (hibridização). Para que a hibridização ocorra, as duas fitas simples devem ter sequências nucleotídicas complementares que permitam o pareamento de bases. Neste exemplo, as fitas em *laranja* e *vermelho* são complementares umas às outras, e as fitas em *azul* e *verde* são complementares umas às outras.

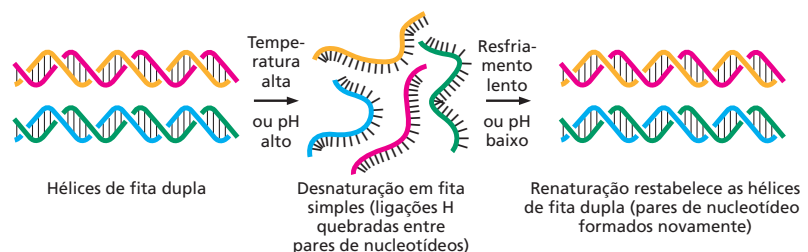
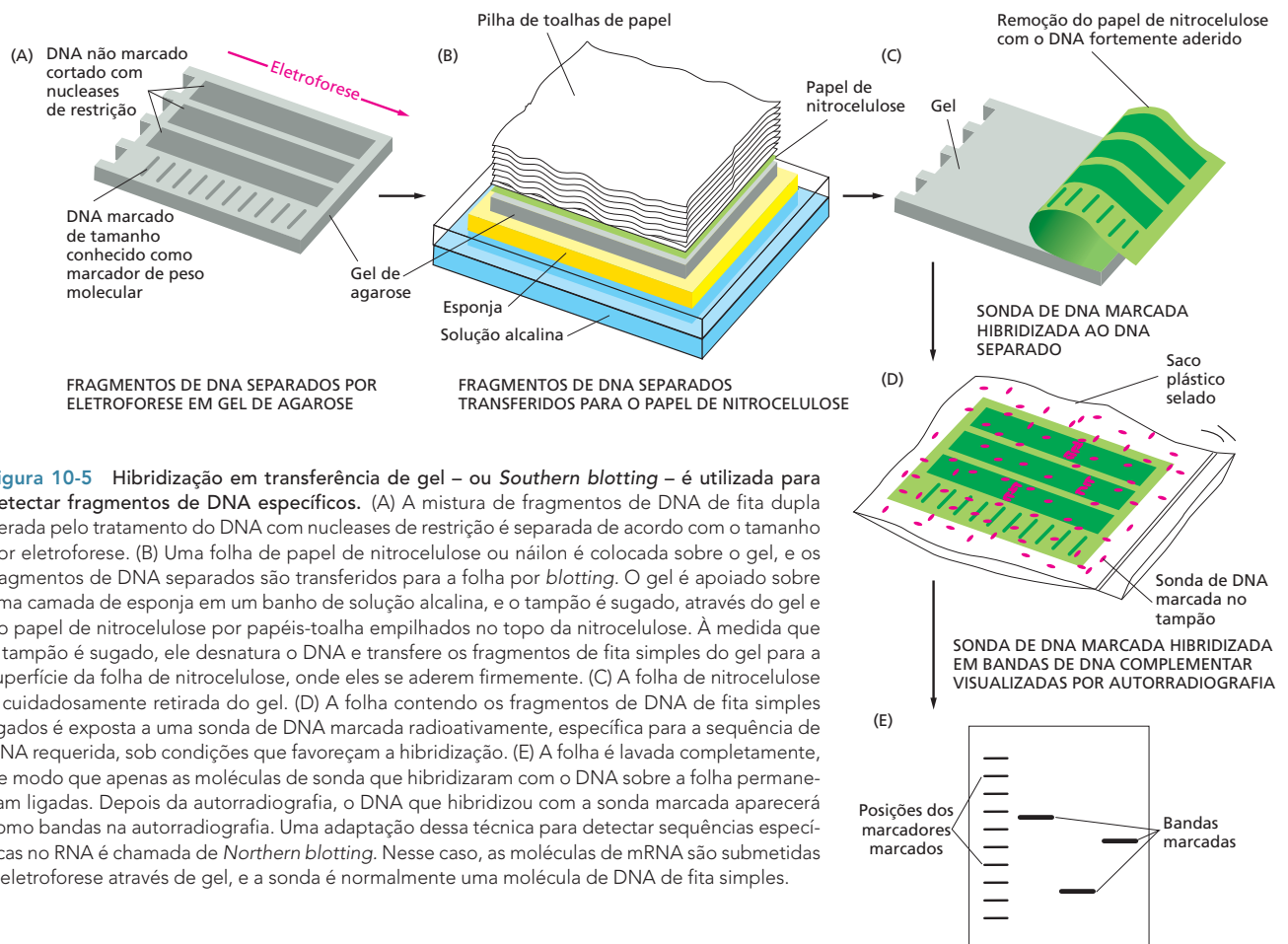



Figura 10-5 Hibridização em transferência de gel – ou *Southern blotting* – é utilizada para detectar fragmentos de DNA específicos. (A) A mistura de fragmentos de DNA de fita dupla gerada pelo tratamento do DNA com nucleases de restrição é separada de acordo com o tamanho por eletroforese. (B) Uma folha de papel de nitrocelulose ou náilon é colocada sobre o gel, e os fragmentos de DNA separados são transferidos para a folha por *blotting.* O gel é apoiado sobre uma camada de esponja em um banho de solução alcalina, e o tampão é sugado, através do gel e do papel de nitrocelulose por papéis-toalha empilhados no topo da nitrocelulose. À medida que o tampão é sugado, ele desnatura o DNA e transfere os fragmentos de fita simples do gel para a superfície da folha de nitrocelulose, onde eles se aderem firmemente. (C) A folha de nitrocelulose é cuidadosamente retirada do gel. (D) A folha contendo os fragmentos de DNA de fita simples ligados é exposta a uma sonda de DNA marcada radioativamente, específica para a sequência de DNA requerida, sob condições que favoreçam a hibridização. (E) A folha é lavada completamente, de modo que apenas as moléculas de sonda que hibridizaram com o DNA sobre a folha permaneçam ligadas. Depois da autorradiografia, o DNA que hibridizou com a sonda marcada aparecerá como bandas na autorradiografia. Uma adaptação dessa técnica para detectar sequências específicas no RNA é chamada de *Northern blotting.* Nesse caso, as moléculas de mRNA são submetidas à eletroforese através de gel, e a sonda é normalmente uma molécula de DNA de fita simples.

a sequência desejada para uma empresa, e as moléculas de DNA poderão ser enviadas em poucos dias.

Uma vez que a sonda estiver em mãos, essa poderá ser utilizada para localizar ácidos nucleicos com uma sequência complementar – incluindo o fragmento de interesse entre uma coleção de fragmentos de DNA que foram separados por tamanho em um gel de agarose. A hibridização resultante com bandas em um gel de agarose pode ser visualizada por *Southern blotting*, um procedimento comum de laboratório chamado assim em homenagem ao cientista que o inventou (Figura 10-5).

As sondas de DNA são amplamente utilizadas na biologia celular. Mais adiante, neste capítulo, veremos como a hibridização com sondas específicas pode ser utilizada para determinar em quais tecidos e em quais estágios do desenvolvimento um gene é transcrito. Contudo, primeiro discutiremos como a hibridização facilita o processo de clonagem de DNA.

CLONAGEM DE DNA

Vimos que moléculas de DNA podem ser clivadas em fragmentos menores utilizando nucleases de restrição e que esses fragmentos podem ser separados por eletroforese em gel. Também vimos que a hibridização pode ser utilizada para selecionar um pareamento com uma sonda de DNA de sequência conhecida. Nesta seção do capítulo, veremos como esses procedimentos são combinados para se obter um pedaço físico de DNA de um genoma. Em outras palavras, discutiremos como um determinado pedaço de qualquer genoma pode ser *clonado*. O termo **clonagem de DNA** literalmente se refere ao ato de fazer várias cópias idênticas de uma molécula de DNA. É essa amplificação que torna possível separar uma determinada extensão de DNA (em geral, um gene de interesse) fisicamente do

resto do DNA da célula – que está presente em quantidades muito pequenas, comparada à massa final da sequência amplificada. A produção de várias cópias de um segmento definido de DNA a partir de um genoma é uma das proezas mais importantes da tecnologia do DNA recombinante, já que ela é o ponto de início para entender a função de cada extensão de DNA dentro do genoma.

A DNA-ligase une fragmentos de DNA para produzir uma molécula de DNA recombinante

A tecnologia de DNA moderna depende tanto da capacidade de quebrar longas moléculas de DNA em fragmentos de tamanhos convenientes como da capacidade de unir esses fragmentos de volta em novas combinações. Qualquer molécula de DNA construída dessa forma no laboratório é chamada de **DNA recombinante**. A própria célula tem fornecido os meios para realizar essas manipulações moleculares. Como discutido no Capítulo 6, a enzima **DNA-ligase** refaz os cortes no esqueleto de DNA que surgem durante a replicação do DNA e o reparo do DNA (ver Figuras 6-16 e 6-26). Essa enzima se tornou uma das ferramentas mais importantes da tecnologia do DNA recombinante, já que ela permite que cientistas unam quaisquer dois fragmentos de DNA (Figura 10-6). Como o DNA possui a mesma estrutura química em todos os organismos, essa simples manobra permite que DNAs de qualquer fonte sejam unidos. Assim, fragmentos de DNA isolados podem ser recombinados no tubo de ensaio para produzir moléculas de DNA que não são encontradas na natureza. Uma vez que duas moléculas de DNA foram ligadas pela ligase, a célula não pode detectar que os dois DNAs eram separados originalmente e tratará o DNA resultante como uma molécula única. Se tal extensão de DNA estranho é apropriadamente introduzida no DNA de uma célula hospedeira, ela irá ser replicada e transcrita como se ele fosse uma parte normal do próprio DNA da célula.

O DNA recombinante pode ser copiado dentro de células bacterianas

A obtenção de várias cópias idênticas de uma extensão definida de DNA, frequentemente um gene, pode ser feita de várias formas. Uma maneira é introduzir o DNA a ser copiado em uma bactéria que se divide rapidamente; cada vez que a bactéria replica o seu próprio DNA, ela também copia o DNA introduzido.

Figura 10-6 Moléculas de DNA recombinante podem ser formadas *in vitro*. A enzima DNA-ligase pode unir quaisquer dois fragmentos de DNA. O ATP fornece a energia necessária para a ligase para restabelecer o esqueleto açúcar-fosfato de DNA. (A) A união de dois fragmentos de DNA produzidos pela nuclease de restrição EcoRI. Note que as extremidades coesivas produzidas por essa enzima permitem que as extremidades dos dois fragmentos formem pares de bases corretamente uma com a outra, facilitando muito a sua união. Essa reação de ligação também constrói novamente o sítio de corte da nuclease de restrição. (B) A união de um fragmento de DNA produzido pela nuclease de restrição HaeIII com uma produzida por AluI. (C) A união de fragmentos de DNA produzidos por EcoRI e HaeIII, respectivamente, utilizando DNA-polimerase para preencher o corte coesivo produzido por EcoRI. Cada fragmento de DNA mostrado na figura é orientado de maneira que as extremidades 5′ são a extremidade esquerda da fita superior e a extremidade direita da fita inferior, como indicado em (A).

Figura 10-7 Algumas bactérias podem captar eficientemente o DNA a partir do meio, um fenômeno chamado de transformação. No laboratório, o DNA para transformação pode ser de qualquer fonte, até mesmo de humanos. Uma vez dentro da célula receptora, o DNA doado pode tornar-se parte do genoma receptor (pelo processo de recombinação homóloga; ver Capítulo 6) ou – em casos especiais – pode ser mantido como um pedaço do DNA independente dos cromossomos bacterianos (como discutiremos a seguir).

O DNA pode ser introduzido em bactérias por um mecanismo chamado de **transformação**. Algumas bactérias captam naturalmente moléculas de DNA presentes na sua volta puxando o DNA através da sua membrana celular para o interior da célula. O DNA que entra é, então, frequentemente incorporado no genoma por recombinação homóloga. O termo "transformação" foi originado das primeiras observações desse fenômeno, no qual parecia que uma cepa bacteriana tinha sido transformada em outra. A transformação deliberada de uma cepa bacteriana com DNA purificado derivado de uma outra cepa forneceu uma das primeiras provas experimentais de que o DNA é realmente o material genético (ver Como Sabemos, p. 174-176).

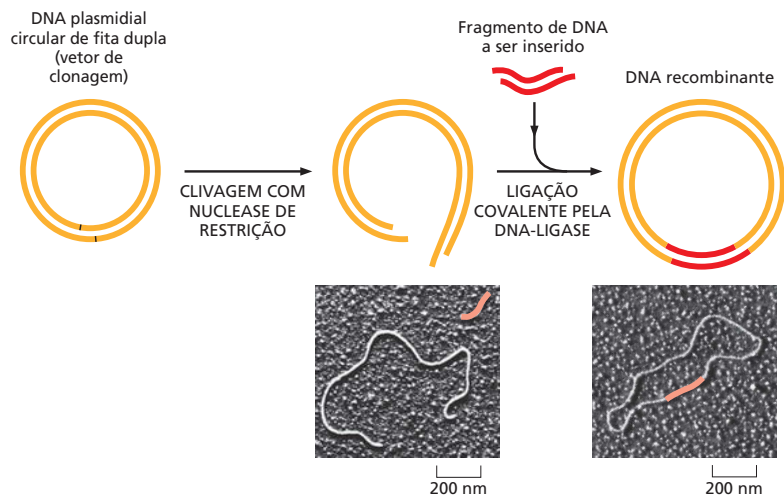
Em uma população natural de bactérias, uma fonte de DNA para transformação é fornecida por bactérias que morreram e liberaram o seu conteúdo, incluindo DNA, para o meio. Entretanto, em um tubo de ensaio, bactérias como *E. coli* podem ser induzidas a captar DNA recombinante que foi criado no laboratório (**Figura 10-7**). Uma grande vantagem para o experimentador é que o DNA desprotegido de qualquer fonte, não apenas o DNA da mesma espécie bacteriana, pode ser introduzido por essa via. Assim, a transformação bacteriana permite que o DNA de organismos complexos, como humanos, seja estudado mais facilmente no laboratório.

Os vetores plasmidiais especializados são utilizados para clonar DNA

Como mencionado, o DNA introduzido em bactérias sob circunstâncias naturais frequentemente se torna parte do genoma bacteriano. Entretanto, pesquisadores interessados em clonagem acharam mais fácil manipular, copiar e purificar o seu DNA recombinante quando ele é mantido como uma molécula independente, separada do cromossomo bacteriano. Para manter o DNA estranho em uma célula bacteriana, um **plasmídeo** bacteriano é utilizado como carreador ou *vetor*. Os plasmídeos normalmente utilizados para clonagem de genes são moléculas de DNA circular relativamente pequenas de vários milhares de pares de nucleotídeos que podem replicar dentro de uma bactéria (**Figura 10-8**). Um vetor plasmidial contém uma origem de replicação que permite a ele replicar-se na célula bacteriana independentemente do cromossomo bacteriano. Ele também tem sítios de corte para nucleases de restrição, de maneira que o plasmídeo pode ser aberto convenientemente e um fragmento de DNA estranho pode ser inserido. Os plasmídeos normalmente também contêm um gene para alguma propriedade que o selecione, como resistência a antibiótico, que permite que a bactéria, que capta o DNA recombinante, seja facilmente identificada.

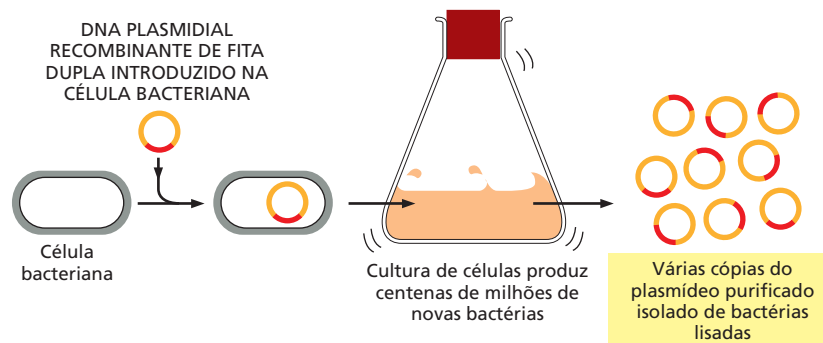
Os plasmídeos ocorrem naturalmente em várias bactérias. Eles foram primeiro reconhecidos por médicos e cientistas porque frequentemente carregam genes que conferem à sua bactéria hospedeira resistência a um ou mais antibióticos. Antibióticos historicamente potentes – penicilina, por exemplo – já não são mais efetivos contra várias das infecções bacterianas atuais porque os plasmídeos que conferem resistência a essa classe de antibióticos se espalharam entre as espécies de bactérias por transferência horizontal (ver Figura 9-17). Os plasmídeos utilizados para pesquisa de DNA recombinante são versões atualizadas desses plasmídeos que ocorrem naturalmente.

Figura 10-8 Plasmídeos bacterianos são normalmente utilizados como vetores de clonagem. Essa molécula de DNA de fita dupla circular consiste em vários milhares de pares de nucleotídeos. A coloração necessária para tornar o DNA visível nessa micrografia eletrônica faz o DNA parecer muito mais espesso do que ele realmente é. (Cortesia de Brian Wells.)

Figura 10-9 Um fragmento de DNA é inserido em um plasmídeo bacteriano utilizando a enzima DNA-ligase. O plasmídeo é cortado com uma nuclease de restrição para abrir (neste caso, uma que produz extremidades coesivas) e é misturado com o fragmento de DNA a ser clonado (que foi preparado utilizando a mesma nuclease de restrição). DNA-ligase e ATP também são adicionados à mistura. As extremidades coesivas fazem o pareamento de bases, e os cortes no esqueleto de DNA são restabelecidos pela DNA-ligase para produzir uma molécula de DNA recombinante completa. Nas micrografias, o fragmento de DNA foi colorido em *vermelho* para facilitar a visualização. (Micrografias, cortesia de Huntington Potter e David Dressler.)

Para inserir um pedaço de DNA a ser clonado em um plasmídeo, o DNA plasmidial purificado é exposto a uma nuclease de restrição que o cliva em apenas um lugar, e o fragmento de DNA a ser clonado é nele inserido usando DNA-ligase (**Figura 10-9**). Essa molécula de DNA recombinante é então introduzida em uma bactéria (normalmente *E. coli)* por transformação, e permite-se que a bactéria cresça em meio nutriente, onde ela duplica em número a cada 30 minutos. Cada vez que ela duplica, o número de cópias da molécula de DNA recombinante também duplica, e, depois de apenas um dia, centenas de milhões de cópias do plasmídeo terão sido produzidas. As bactérias são então rompidas, e o DNA do plasmídeo é purificado (por virtude do seu tamanho pequeno) do resto do conteúdo celular, incluindo o grande cromossomo bacteriano. A preparação purificada do DNA plasmidial conterá milhões de cópias do fragmento de DNA original (**Figura 10-10**). Esse fragmento de DNA pode ser recuperado pela sua excisão a partir do DNA plasmidial, utilizando a enzima de restrição apropriada e a separação, do DNA plasmidial, por eletroforese em gel (ver Figura 10-3). Essas etapas permitem a efetiva purificação de uma dada extensão de DNA a partir do genoma de qualquer organismo.

Os genes humanos podem ser isolados a partir de bibliotecas de DNA

Vimos como qualquer fragmento de DNA pode ser produzido em grande número pela sua inserção em uma bactéria. No entanto, como esses fragmentos de DNA são identificados e escolhidos na primeira vez? Mais especificamente, sem saber cada sequência gênica com antecedência, como foram isolados pela primeira vez os genes humanos? Como um exemplo, descreveremos a clonagem do gene para a proteína humana de coagulação, Fator VIII. Embora os métodos pelos quais os

Figura 10-10 Um fragmento de DNA pode ser replicado dentro de uma célula bacteriana. Para clonar um determinado fragmento de DNA, ele é primeiro inserido em um vetor plasmidial, como mostrado na Figura 10-9. O DNA plasmidial recombinante resultante é, então, introduzido em uma bactéria por transformação; ele então pode ser replicado vários milhões de vezes à medida que as bactérias se multiplicam. Para simplificar, o genoma da célula bacteriana não é mostrado.

genes humanos foram isolados difiram do caso descrito aqui, o exemplo ilustra várias das características gerais da clonagem de DNA.

Os defeitos no gene para o Fator VIII são a causa para o tipo mais comum de hemofilia – a hemofilia A. Essa doença geneticamente determinada tem sido reconhecida por mais de mil anos e afeta aproximadamente um em 10.000 homens. Pessoas com hemofilia A falham na produção do Fator VIII totalmente ativo e por isso têm episódios repetidos de sangramento descontrolado. Até recentemente, o tratamento-padrão para essa doença tem sido a injeção da proteína Fator VIII concentrada, coletada a partir de várias amostras de sangue. Tragicamente, antes do sangue ter sido analisado para HIV (o vírus da AIDS) de forma rotineira, esse tratamento expôs vários hemofílicos à infecção por HIV. A produção comercial de Fator VIII puro utilizando a tecnologia de DNA recombinante oferece uma melhora significativa no tratamento da hemofilia. Essa façanha precisou da clonagem do gene humano normal que codifica para o Fator VIII e da montagem da sua sequência codificante. Essa sequência de DNA foi então utilizada para produzir grandes quantidades da proteína purificada, como descreveremos.

Trabalhar com 3×10^9 pares de nucleotídeos do genoma humano completo é uma tarefa desanimadora, e a primeira etapa na clonagem de qualquer gene humano é quebrar o DNA genômico total em pedaços menores mais manejáveis. Um procedimento geral para realizar isso está resumido na **Figura 10-11**. Primeiro, o DNA humano é extraído de uma amostra de tecido ou cultura de células e clivado com uma nuclease de restrição, que produz milhões de fragmentos de DNA diferentes. A mistura dos fragmentos de DNA é então ligada em vetores plasmidiais sob condições que favorecem a inserção de um fragmento de DNA para cada molécula de plasmídeo. Esses plasmídeos recombinantes são misturados com uma cultura de *E. coli* em uma concentração que assegura que não mais de uma molécula de plasmídeo seja captada por cada bactéria. A coleção de fragmentos de DNA clonados na cultura bacteriana resultante é conhecida como **biblioteca de DNA**. Nesse caso, ela é chamada de *biblioteca genômica,* já que os fragmentos de DNA são derivados diretamente do DNA cromossomal. Se colônias derivadas de uma única bactéria são isoladas em placas de Petri, cada colônia de bactéria representará o clone de uma determinada extensão de DNA humano. Uma coleção de vários milhões de colônias nessa biblioteca deveria, portanto, representar todo o genoma humano.

Figura 10-11 Bibliotecas de fragmentos de DNA genômico humano podem ser construídas utilizando nucleases de restrição e ligase. Uma biblioteca genômica consiste em um grupo de bactérias, cada uma carregando um pequeno fragmento diferente de DNA humano. Para simplificação, apenas os fragmentos de DNA *coloridos são* mostrados na biblioteca; todos os fragmentos em *cinza* também serão representados.

Para encontrar um determinado gene, agora enfrentamos um problema análogo àquele de entrar em uma biblioteca real com milhões de livros e constatar que não existe nenhum catálogo ou lista computadorizada para nos ajudar a achar o volume que precisamos. Como encontraremos uma determinada extensão de DNA (em nosso caso, o gene do Fator VIII) na vasta biblioteca de DNA humano? A chave é aproveitar-se das propriedades de hibridização dos ácidos nucleicos discutidas anteriormente neste capítulo. Se tivéssemos uma sonda de DNA para o gene do Fator VIII, poderíamos utilizá-la para encontrar o clone que forma pares de bases com ela na biblioteca. Contudo, de onde uma sonda dessas veio antes que o próprio gene tenha sido identificado?

No caso do Fator VIII, uma pequena quantidade da proteína foi purificada a partir de doadores de sangue humano, utilizando a coagulação sanguínea como ensaio bioquímico. A sequência parcial de aminoácidos da proteína foi deduzida (atualmente, isso seria realizado pela utilização da espectrometria de massa; ver Figura 4-45). Aplicando o código genético ao contrário, essa informação da sequência de aminoácidos foi então utilizada para deduzir a sequência nucleotídica parcial do gene. Essa sequência de nucleotídeos foi então sintetizada quimicamente para criar uma sonda de DNA. Utilizando essa sonda, os clones bacterianos raros na biblioteca de DNA que contêm o fragmento complementar do Fator VIII foram identificados por hibridização (**Figura 10-12**).

Quando uma sonda de Fator VIII como essa foi primeiro utilizada em uma biblioteca genômica humana, um único clone complementar da biblioteca de DNA foi identificado. A sequência nucleotídica desse DNA clonado mostrou que ele continha apenas uma pequena parte do gene do Fator VIII e que o gene inteiro teria de ser laboriosamente montado. Agora sabemos que o gene para o Fator

Figura 10-12 Uma colônia bacteriana que carrega um determinado clone de DNA pode ser identificada por hibridização. Uma réplica do arranjo de colônias sobre a placa de Petri é realizada pressionando-se um pedaço de papel absorvente contra a superfície da placa. Essa réplica é tratada com uma solução alcalina (para lisar as células e separar o DNA plasmidial em fitas simples), e o papel é então hibridizado com uma sonda de DNA altamente radioativa. Aquelas colônias bacterianas que se ligaram à sonda são identificadas por autorradiografia. Células vivas que contêm o plasmídeo podem ser isoladas a partir da placa original.

VIII tem 180.000 pares de nucleotídeos de comprimento e contém vários íntrons (ver Figura 7-18B), de modo que foi pouco surpreendente que nenhum clone genômico contivesse o gene inteiro.

Vários genes humanos foram identificados originalmente e clonados utilizando variações no procedimento descrito para o Fator VIII. Entretanto, agora que a sequência genômica humana completa é conhecida, a clonagem de um determinado gene normalmente é muito mais fácil. Por exemplo, uma vez que a sequência parcial de aminoácidos de uma proteína de interesse é conhecida, ela pode, com o auxílio de computadores, ser utilizada para procurar diretamente na sequência genômica humana o gene que a codifica. Uma vez que o gene foi encontrado no banco de dados eletrônico, pode-se desenhar sondas para puxar o gene de uma biblioteca de DNA. Até mesmo é possível, como descreveremos brevemente, clonar o gene diretamente de uma amostra de DNA humano, deixando de lado totalmente o uso de uma biblioteca.

As bibliotecas de cDNA representam o mRNA produzido por um determinado tecido

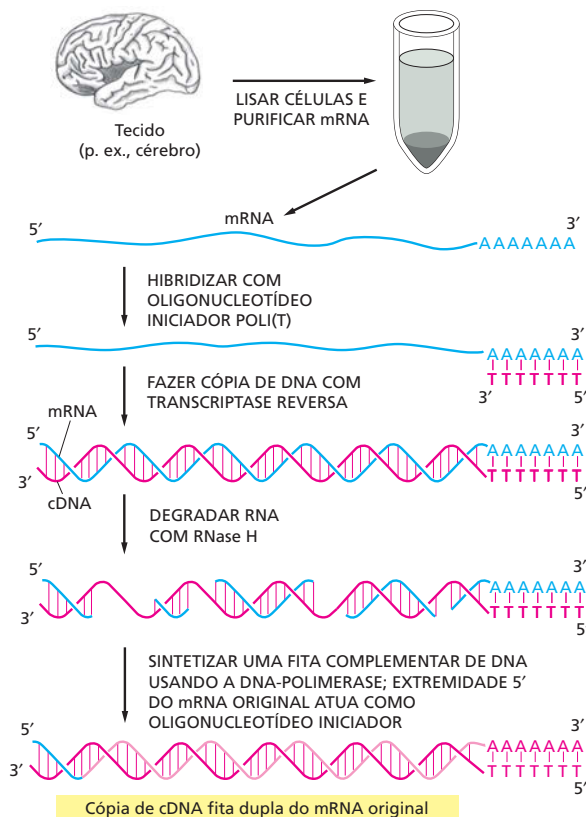
Para várias aplicações, é vantajoso obter um gene em uma forma que contenha apenas a sequência codificante, isto é, uma forma que não tenha íntrons de DNA. Por exemplo, no caso do gene do Fator VIII, o clone genômico completo – íntrons e éxons – é tão grande e de difícil manejo que é necessário trabalhar com pedaços do gene. Além disso, se alguém quer deduzir a sequência de aminoácidos completa da proteína Fator VIII apenas a partir da sequência de nucleotídeos do seu gene, seria difícil imaginar onde cada éxon inicia e termina; afinal, a maior parte da sequência do gene é sequência de íntrons (ver Figura 7-18B). Felizmente, é relativamente simples isolar um gene livre de todos os seus íntrons. Com essa finalidade, um tipo diferente de biblioteca de DNA, denominada *biblioteca de cDNA,* é utilizada.

Uma biblioteca de cDNA humano é similar à biblioteca genômica humana no que ela também possui várias sequências de DNA humano diferentes. Entretanto, ela difere em um aspecto importante. O DNA que faz parte de uma biblioteca de cDNA não é DNA genômico, mas sim DNA copiado a partir de mRNAs presentes em um determinado tecido ou cultura celular. Para preparar uma biblioteca de **cDNA**, o mRNA total é extraído de células, e cópias de DNA das moléculas de mRNA são produzidas pela enzima transcriptase reversa (**Figura 10-13**). Essas moléculas de DNA complementar – ou cDNA – são então clonadas, exatamente como os fragmentos de DNA genômico descritos anteriormente, para produzir a biblioteca de cDNA. Por exemplo, com a utilização de uma biblioteca de cDNA como essa, preparada a partir de fígado, o órgão que normalmente produz o Fator VIII, foi possível isolar a sequência codificante completa do gene do Fator VIII, privada de íntrons, e presente em um pedaço de DNA. O cDNA do Fator VIII foi isolado a partir de uma biblioteca de cDNA pela utilização de uma porção do DNA genômico do Fator VIII como sonda, pelo procedimento mostrado na

Figura 10-12. Veremos na parte final deste capítulo como a sequência codificante do gene foi utilizada para produzir a proteína humana Fator VIII purificada, em escala comercial.

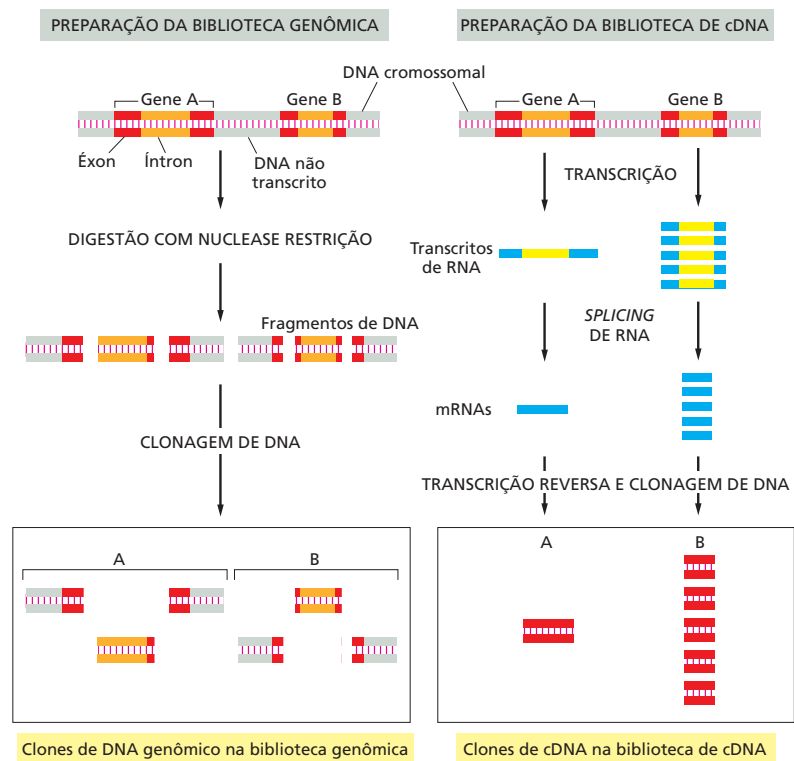
Existem várias diferenças importantes entre os clones de DNA genômico e os clones de cDNA, como ilustrado na **Figura 10-14**. Clones genômicos representam uma amostra randômica de todas as sequências de DNA encontradas no genoma de um organismo e, com raras exceções, conterão as mesmas sequências indiferentemente do tipo celular a partir do qual o DNA proveio. Além disso, clones genômicos de eucariotos contêm grandes quantidades de sequências de DNA repetitivas, íntrons, DNA regulador e DNA espaçador; sequências que codificam para proteínas farão parte de apenas poucos por cento da biblioteca (ver Figura 9-29). Ao contrário, os clones de cDNA contêm predominantemente sequências codificantes e apenas aquelas para genes que foram transcritos em mRNA no tecido do qual o RNA proveio. Como as células de diferentes tecidos produzem conjuntos distintos de moléculas de mRNA, uma biblioteca de cDNA diferente será obtida para cada tipo de tecido. Padrões de expressão gênica alteram durante o desenvolvimento; assim, bibliotecas de cDNA também refletirão os genes expressados por células em diferentes estágios no seu desenvolvimento.

Sem dúvida, a vantagem mais importante dos clones de cDNA é que eles contêm a sequência codificante ininterrupta do gene. Portanto, se o objetivo da clonagem do gene é deduzir a sequência de aminoácidos da proteína a partir do DNA ou produzir a proteína em massa pela expressão do gene clonado em uma célula bacteriana ou de levedura (nenhuma das quais pode remover íntrons dos transcritos de RNA de mamífero), é essencial iniciar com cDNA.

A principal vantagem dos clones genômicos, por outro lado, é que eles contêm íntrons, assim como éxons, e eles incluem as sequências reguladoras que determinam quando e onde os genes são expressados. Por essa razão, os clones genômicos são utilizados para determinar as sequências nucleotídicas completas dos genomas, como veremos mais adiante no capítulo.

QUESTÃO 10-3

Discuta a seguinte afirmação: "A partir da sequência de nucleotídeos de um clone de cDNA, a sequência completa de aminoácidos de uma proteína pode ser deduzida pela aplicação do código genético. Assim, a bioquímica de proteínas se tornou supérflua, pois não existe mais nada para ser aprendido pelo estudo das proteínas".

Figura 10-13 **DNA complementar (cDNA) pode ser preparado a partir de mRNA.** O mRNA total é extraído a partir de um determinado tecido, e cópias de DNA (cDNA) das moléculas de mRNA são produzidas pela enzima transcriptase reversa (ver Figura 6-38). Para simplificação, a cópia de apenas um desses mRNAs em cDNA é ilustrada aqui.

Figura 10-14 Clones de DNA genômico e clones de cDNA derivados da mesma região do DNA são diferentes. Neste exemplo, o gene A não é frequentemente transcrito, e o gene B é com frequência transcrito, e ambos os genes contêm íntrons *(cor laranja)*. Na biblioteca de DNA genômico, tanto íntrons como DNA não transcrito *(cinza)* são incluídos nos clones, e a maioria dos clones conterá apenas uma parte da sequência codificante de um gene *(vermelho)*. Nos clones de cDNA, as sequências de íntrons foram removidas pelo processamento do RNA durante a formação do mRNA *(azul)*, e uma sequência codificante contínua está, por isso, presente em cada clone. Como o gene B é transcrito com maior frequência do que o gene A nas células a partir das quais a biblioteca de cDNA foi sintetizada, ele estará representado muito mais frequentemente do que A na biblioteca de cDNA. Em contraste, A e B deveriam estar igualmente representados na biblioteca genômica.

A reação em cadeia da polimerase amplifica sequências de DNA selecionadas

A clonagem via bibliotecas de DNA foi outrora a única rota para o isolamento de um gene e ainda é utilizada no sequenciamento de genomas inteiros e no procedimento com genes muito grandes. Entretanto, um método conhecido como **reação em cadeia da polimerase** (**PCR**, de *polymerase chain reaction*) fornece uma alternativa mais rápida e simples para várias aplicações de clonagem, particularmente para aqueles organismos cuja sequência completa do genoma é conhecida. Atualmente, a maior parte das clonagens é realizada utilizando PCR.

Inventada na década de 1980, uma PCR pode ser realizada inteiramente *in vitro* sem o uso de células. Pela utilização dessa técnica, uma determinada sequência de nucleotídeos pode ser replicada seletiva e rapidamente em grandes quantidades a partir de qualquer amostra de DNA que a contenha. Por exemplo, a PCR é agora amplamente utilizada para fornecer grandes quantidades de qualquer gene a partir de uma pequena amostra de DNA humano. Ela também tem várias outras aplicações, inclusive a amplificação de DNA para uso em testes de diagnóstico de doenças genéticas e na medicina forense, como discutido brevemente.

A PCR se baseia no uso da DNA-polimerase para copiar um molde de DNA em ciclos repetidos de replicação. A polimerase é guiada para a sequência a ser copiada por oligonucleotídeos iniciadores de DNA curtos *(primers)* que são adicionados à reação e hibridizam o DNA-molde no início e no final da sequência de DNA desejada. Esses oligonucleotídeos iniciadores fornecem as extremidades 3′ para que a DNA-polimerase inicie a replicação em cada fita de DNA. Os oligonucleotídeos devem ser desenhados pelo pesquisador e sintetizados; assim, a PCR só pode ser utilizada para clonar um DNA cujas sequências iniciais e finais sejam conhecidas. Durante cada ciclo de replicação, as duas fitas do DNA-molde de fita dupla são separadas e copiadas independentemente. A **Figura 10-15** mostra as etapas separadas no primeiro ciclo de replicação. Após vários desses ciclos de replicação, várias cópias da sequência – normalmente bilhões – terão sido feitas (**Figura 10-16**). A PCR é extremamente sensível; ela pode detectar uma única có-

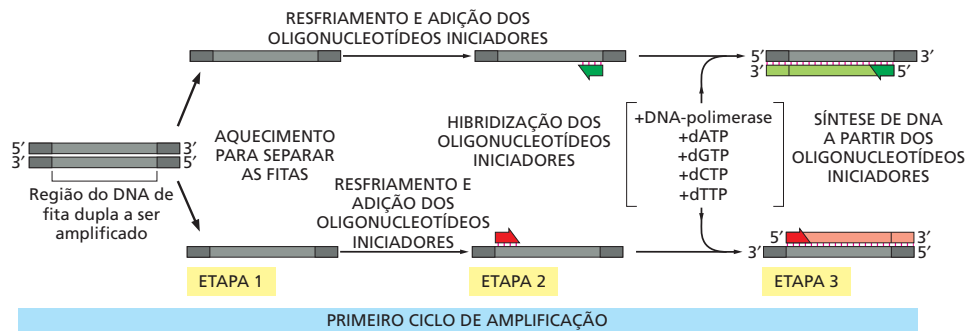



Figura 10-15 **Oligonucleotídeos iniciadores de uma PCR direcionam a amplificação do pedaço de DNA desejado.** O conhecimento da sequência de DNA a ser amplificada é utilizado para projetar duas moléculas de DNA sintéticas curtas, cada uma complementar à sequência da dupla-hélice de DNA em extremidades opostas da região a ser amplificada. Essas moléculas de DNA servem como oligonucleotídeos iniciadores para a síntese de DNA *in vitro*, que é realizada por uma DNA-polimerase, e determinam o segmento do DNA a ser amplificado. Cada ciclo da PCR inclui três etapas. Primeiro, um DNA de fita dupla é aquecido brevemente para separar as duas fitas (etapa 1). Após a separação das fitas, o resfriamento do DNA na presença de um excesso dos dois oligonucleotídeos iniciadores permite que esses iniciadores hibridizem com sequências complementares nas duas fitas de DNA (etapa 2). Essa mistura é, então, incubada com DNA-polimerase e os quatro trifosfatos de desoxirribonucleosídeo, de maneira que o DNA é sintetizado iniciando a partir dos dois oligonucleotídeos iniciadores (etapa 3). O ciclo é então iniciado novamente por um tratamento de aquecimento para separar as fitas de DNA recém-sintetizadas. A técnica depende do uso de uma DNA-polimerase especial isolada a partir de uma bactéria termofílica; essa polimerase é estável a temperaturas muito mais altas do que as DNA-polimerases de eucariotos. Assim, ela não é desnaturada pelo tratamento de aquecimento mostrado na etapa 1. Portanto, ela não precisa ser adicionada novamente após cada ciclo da PCR.

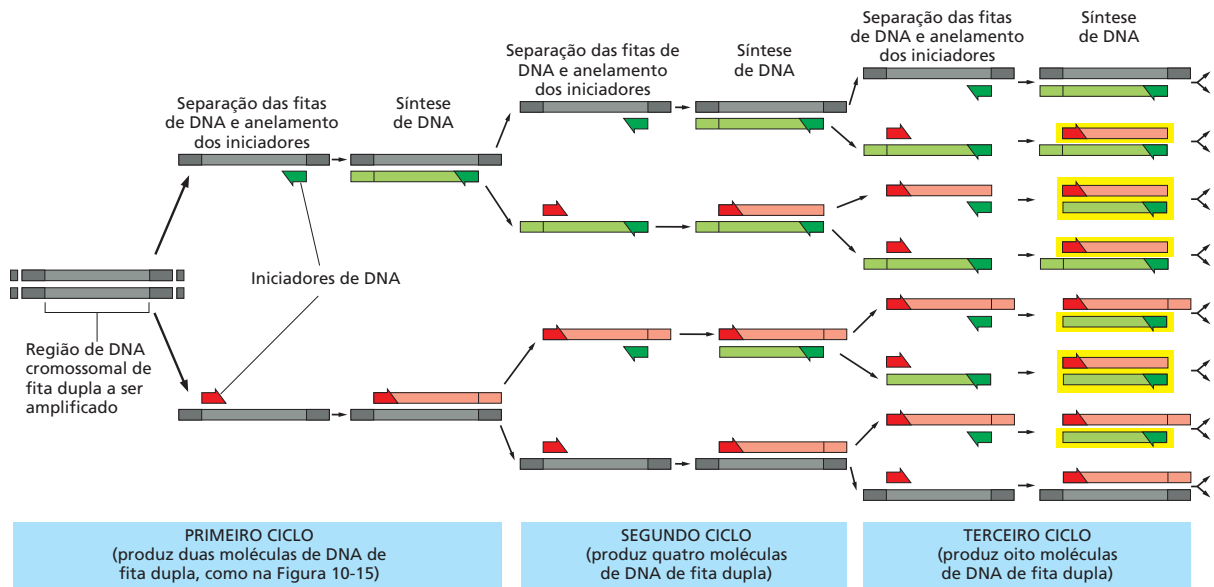



Figura 10-16 **A PCR utiliza ciclos repetidos de separação, hibridização e síntese das fitas para amplificar o DNA.** Como o procedimento mostrado na Figura 10-15 é realizado sempre novamente, os fragmentos recém-sintetizados servem como molde para o seu ciclo. Cada ciclo duplica a quantidade de DNA sintetizado no ciclo anterior, e, após alguns ciclos, o DNA predominante é idêntico à sequência-molde inicial delimitada pelos dois iniciadores, incluindo os dois iniciadores. No exemplo ilustrado aqui, três ciclos de reação produzem 16 cadeias de DNA, 8 das quais *(em amarelo)* são do mesmo comprimento e correspondem exatamente a uma ou outra fita da sequência original delimitada pelos iniciadores mostrada no extremo esquerdo; as outras fitas contêm DNA extra que está além da sequência original, que é replicado nos primeiros ciclos. Depois de mais 4 ciclos, 240 das 256 cadeias corresponderão exatamente à sequência original e, depois de mais alguns ciclos, essencialmente todas as fitas de DNA terão esse único comprimento. Embora todo o DNA presente no início da PCR permaneça presente, a sua quantidade é tão pequena que a sua presença é insignificante. Na prática, 20-30 ciclos são necessários para uma amplificação útil de DNA. Cada ciclo leva apenas cerca de 5 minutos, e a automação de todo o procedimento agora permite a clonagem, livre de células, de um fragmento de DNA em poucas horas, comparado com os vários dias necessários para as metodologias normais de clonagem. O procedimento completo é mostrado na **Animação 10.1**.

pia de uma sequência de DNA em uma amostra amplificando-a tanto que ela se torna detectável, por exemplo, por coloração após a separação por eletroforese em gel (ver Figura 10-3).

Existem várias aplicações especialmente úteis para a PCR. Primeiro, a PCR é o método de escolha para clonagem de fragmentos de DNA relativamente curtos (digamos, abaixo de 10.000 pares de nucleotídeos) a partir de uma célula. O molde original para a reação pode ser DNA ou RNA, desse modo, a PCR pode ser utilizada para obter ou uma cópia genômica inteira (completa com íntrons e éxons) ou uma cópia de cDNA do gene (**Figura 10-17**). A beleza desse método é que os genes podem ser clonados diretamente a partir de qualquer pedaço de DNA ou RNA sem o tempo nem esforço necessários para primeiro construir uma biblioteca de DNA.

Outra aplicação para a PCR, que se baseia na sua sensibilidade extraordinária, é a detecção de infecções por patógenos em estágios bastante iniciais. Nesse caso, sequências curtas complementares ao genoma do patógeno são utilizadas como iniciadores e, depois de vários ciclos de amplificação, a presença ou a ausência de até mesmo poucas cópias de um genoma invasivo em uma amostra de sangue pode ser determinada (**Figura 10-18**). Para várias infecções, a PCR é o método mais sensível para detecção; ela já está substituindo o uso de anticorpos contra proteínas de superfície para detectar a presença de patógenos em amostras humanas.

Finalmente, a PCR tem um grande potencial na medicina forense. A sua sensibilidade extrema torna possível trabalhar com uma amostra muito pequena – traços mínimos de sangue e tecido que possam conter restos de apenas uma única célula – e ainda se obter uma *impressão digital de DNA* da pessoa da qual a amostra proveio. O genoma de cada ser humano (com exceção de

QUESTÃO 10-4

A. Se a reação de PCR mostrada na Figura 10-16 é realizada com dois ciclos adicionais de amplificação, quantos dos fragmentos de DNA marcados em cinza, verde ou vermelho ou realçados em amarelo serão produzidos? Se vários ciclos adicionais são realizados, quais fragmentos predominarão?

B. Imagine que você inicie com uma molécula de DNA de fita dupla e amplifique uma sequência de 500 pares de nucleotídeos contida nela. Aproximadamente, quantos ciclos de amplificação por PCR você irá precisar para produzir 100 ng desse DNA? 100 ng é uma quantidade que pode ser facilmente detectada após a coloração com um agente fluorescente. (Dica: para esse cálculo, você precisa saber que cada nucleotídeo tem uma massa molecular média de 330 g/ mol.)

Figura 10-17 **A PCR pode ser utilizada para obter clones genômicos ou de cDNA.** (A) Para obter um clone genômico utilizando PCR, o DNA cromossomal é primeiro purificado a partir de células. Iniciadores para PCR que flanqueiam a extensão de DNA a ser clonada são adicionados, e vários ciclos da reação de PCR são completados (ver Figura 10-16). Como apenas o DNA entre (inclusive) os iniciadores é amplificado, a PCR fornece um meio para obter seletivamente uma extensão curta de DNA cromossomal em uma forma efetivamente pura. (B) Para usar PCR para obter um clone de cDNA de um gene, o mRNA é primeiro purificado a partir de células. O primeiro iniciador é então adicionado à população de mRNAs, e a transcriptase reversa é utilizada para fazer uma fita de DNA complementar. O segundo iniciador é, então, adicionado, e a molécula de DNA de fita simples é amplificada por vários ciclos da PCR.

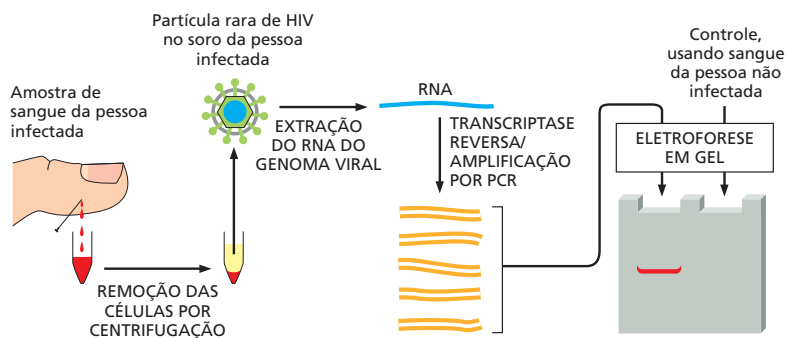



Figura 10-18 A PCR pode ser utilizada para detectar a presença de um genoma de vírus em uma amostra de sangue. Por causa da sua capacidade de amplificar muito o sinal a partir de cada molécula única de ácido nucleico, a PCR é um método extraordinariamente sensível para detectar quantidades mínimas de vírus em uma amostra de sangue ou tecido sem a necessidade de purificar o vírus. Para o HIV, o vírus causador da AIDS, o genoma é uma molécula de RNA de fita simples. Além do HIV, vários vírus que infectam humanos são agora monitorados dessa maneira.

gêmeos idênticos) difere na sequência de DNA do genoma de cada outro ser humano; o DNA amplificado pela PCR usando um determinado par de iniciadores é, portanto, provavelmente diferente na sequência de um indivíduo para outro. Utilizando um grupo de pares de iniciadores cuidadosamente selecionados que cobrem as partes bastante variáveis conhecidas do genoma humano, a PCR pode gerar uma impressão digital de DNA distinta para cada indivíduo (**Figura 10-19**).

DECIFRANDO E EXPLORANDO A INFORMAÇÃO GENÉTICA

Até agora, neste capítulo, assumimos que a função do gene que desejamos estudar é conhecida – ao menos em linhas gerais; mas suponha que você tenha descoberto um gene que codifica para uma proteína com função desconhecida. Como você determina o que a proteína faz? Agora que os projetos do sequenciamento do genoma estão identificando rapidamente novos genes apenas a partir da sequência do DNA, essa está se tornando uma questão comum em biologia celular. Por exemplo, dos 25.000 genes humanos que foram identificados (ver Como Sabemos, p. 318-319), mais de 10.000 genes possuem funções ainda desconhecidas.

Os procedimentos descritos até agora permitem aos biólogos obter grandes quantidades de DNA em uma forma que é fácil de ser trabalhada no laboratório. Presente na forma de fragmentos armazenados em uma biblioteca de DNA ou como uma coleção de produtos da PCR no fundo de um tubo de ensaio, esse DNA fornece a matéria-prima para os experimentos mais excitantes: aqueles designados a revelar como genes individuais – e as moléculas de RNA e proteínas para as quais eles codificam – funcionam dentro de organismos vivos.

Nesse ponto do processo, biólogos podem ser especialmente criativos, pois existem tantos meios de abordar o problema da função gênica quanto são os cientistas que desejam resolvê-lo. As técnicas que os investigadores utilizam para explorar a atividade de um gene muitas vezes dependem da sua experiência e do seu treinamento: geneticistas podem optar pela alteração genética de organismos mutantes nos quais a atividade do gene foi perdida; bioquímicos podem utilizar o gene para produzir grandes quantidades de proteína para determinar suas atividades enzimáticas e estrutura tridimensional, e aqueles que são mais inclinados para a informática podem começar a rastrear as bases de dados por genes com sequências ou padrões de expressão similares. Embora essas abordagens difiram em termos de experiência e equipamentos necessários para executá-las, todas são desenhadas para gerar pistas sobre o que um gene faz dentro de uma célula ou organismo.

Nesta seção, apresentaremos alguns dos métodos que são utilizados para determinar a função de um gene. Como todas essas abordagens iniciam com a sequência nucleotídica de um gene, começaremos descrevendo as técnicas utilizadas para sequenciar uma extensão de DNA. Então discutiremos como cientistas podem iniciar a interpretar a informação codificada nessa sequência nucleo-

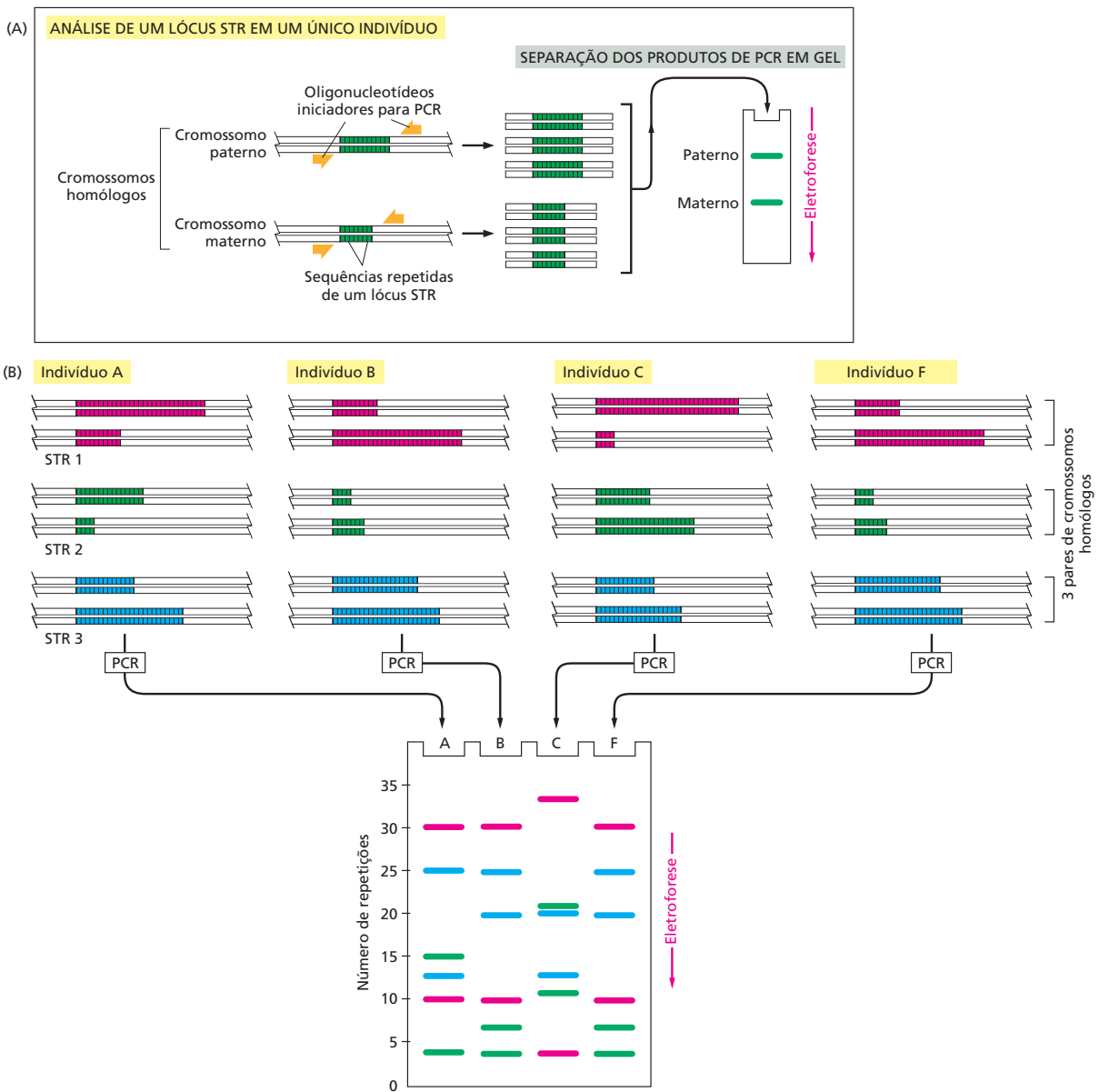



Figura 10-19 A PCR é utilizada em ciência forense para distinguir um indivíduo de outro. (A) As sequências de DNA utilizadas nessa análise são repetições curtas *in tandem* (STRs, de *short tandem repeats*) compostas de sequências como CACACA... ou GTGTGT..., que são encontradas em várias posições (lócus) no genoma humano. O número de repetições em cada STR é bastante variável na população, variando de 4 a 40 em indivíduos diferentes. Por causa da variabilidade nessas sequências, indivíduos normalmente herdarão uma variante diferente de cada lócus STR a partir da sua mãe e a partir do seu pai; portanto, dois indivíduos não relacionados normalmente não conterão o mesmo par de sequências. Uma reação de PCR utilizando iniciadores que englobem o lócus produz um par de bandas de DNA amplificado a partir de cada indivíduo, uma banda representando a variante STR materna, e a outra representando a variante STR paterna. O comprimento do DNA amplificado e, portanto, a sua posição depois da eletroforese dependerá do número exato de repetições no lócus. (B) No exemplo esquemático mostrado aqui, os mesmos três lócus STR são analisados, a partir de três suspeitos (indivíduos A, B e C), produzindo seis bandas para cada indivíduo após a eletroforese em gel de poliacrilamida. Embora pessoas diferentes possam ter várias bandas em comum, o padrão geral é bastante distinto para cada pessoa. O padrão de bandas pode, portanto, servir como uma "impressão digital" para identificar um indivíduo quase como único. A quarta canaleta (F) contém os produtos das mesmas reações de PCR realizadas em uma amostra forense de DNA. O DNA pode ser obtido a partir de um único fio de cabelo ou de uma minúscula amostra de sangue deixada na cena do crime. Quanto mais lócus forem examinados, mais confiantes podemos estar sobre os resultados. Quando estamos analisando a variabilidade em 5-10 lócus STR diferentes, a probabilidade de que dois indivíduos aleatórios compartilhem a mesma impressão digital por acaso é de aproximadamente uma em 10 bilhões. No caso mostrado aqui, os indivíduos A e C podem ser eliminados das investigações, e B permanece um suspeito claro. Uma abordagem similar é, agora, utilizada rotineiramente para testes de paternidade.

tídica. Depois revisaremos como a tecnologia do DNA recombinante pode ser utilizada, uma vez que o gene estiver em mãos, para produzir RNA ou produto proteico suficiente para conduzir os estudos estruturais e funcionais. Finalmente, descreveremos algumas técnicas para investigar o que um gene faz dentro de uma célula, tecido ou mesmo em toda uma planta ou animal. Esses métodos revolucionaram todos os aspectos da biologia celular, fornecendo novos meios para estudar as funções dos genes, moléculas de RNA e proteínas.

O DNA pode ser rapidamente sequenciado

No final da década de 1970, pesquisadores desenvolveram métodos que permitiram que a sequência de nucleotídeos de qualquer fragmento de DNA purificado fosse determinada simples e rapidamente. Essas técnicas tornaram possível determinar as sequências completas de nucleotídeos de centenas de milhares de genes e as sequências genômicas completas de vários organismos, incluindo a levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae*, o verme nematódeo *Caenorhabditis elegans,* a mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster*, a planta-modelo *Arabidopsis thaliana,* o cão, o rato, o chimpanzé, o gorila e o ser humano.

Vários esquemas de sequenciamento foram desenvolvidos, mas o mais utilizado é o **sequenciamento de DNA didesoxi**, um método com base na síntese de DNA realizada *in vitro* na presença de trifosfatos de didesoxirribonucleosídeo terminadores de cadeia. Nessa técnica, a DNA-polimerase é utilizada para fazer cópias parciais do fragmento de DNA a ser sequenciado. Essas reações de replicação do DNA são realizadas sob condições que asseguram que as novas fitas de DNA terminem quando um dado nucleotídeo (A, G, C, ou T) seja alcançado (**Figura 10-20**). Finalmente, essas reações produzem uma coleção de diferentes cópias de DNA que terminam em todas as posições no DNA original e assim diferem no comprimento por apenas um nucleotídeo. Essas cópias de DNA podem ser separadas com base no seu comprimento por eletroforese em gel, e a sequência de nucleotídeos do DNA original pode ser determinada a partir da ordem desses fragmentos de DNA no gel (**Figura 10-21**).

Embora o mesmo método básico ainda seja utilizado hoje em dia, vários aperfeiçoamentos têm sido realizados. Atualmente, o sequenciamento de DNA é completamente automatizado: aparelhos robóticos misturam os reagentes e

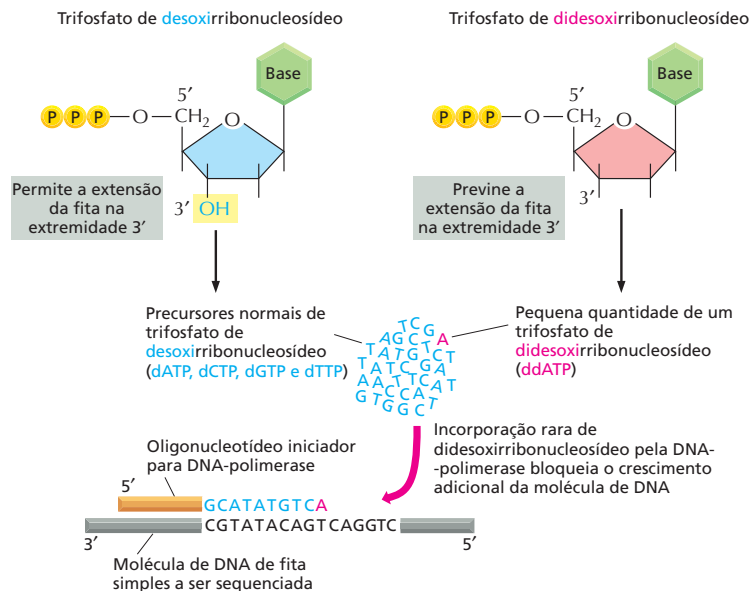
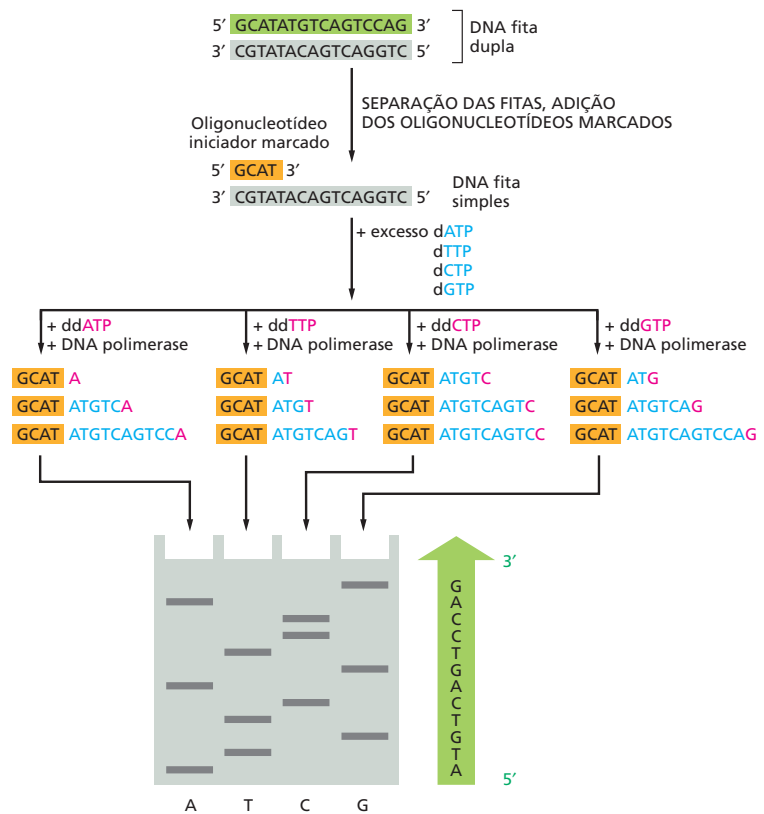



Figura 10-20 O método didesoxi para sequenciar DNA se baseia no término das cadeias com trifosfato de didesoxinucleosídeo. Esses trifosfatos de didesoxirribonucleosídeo, derivados dos trifosfatos de desoxirribonucleosídeo normais, não possuem o grupo 3′ hidroxila. O DNA purificado é sintetizado *in vitro* em uma mistura que contém moléculas de fita simples do DNA a ser sequenciado *(cinza)*, a enzima DNA-polimerase, um oligonucleotídeo iniciador curto de DNA *(laranja)* para permitir que a polimerase inicie a replicação e os quatro trifosfatos de desoxirribonucleosídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP: A, C, G e T *azul)*. Se um análogo do didesoxirribonucleosídeo de um desses nucleotídeos (aqui, um ddATP em *vermelho*) também está presente na mistura de nucleotídeos, ele pode tornar-se incorporado na cadeia de DNA crescente. A cadeia agora não tem um grupo 3′ OH, a adição do próximo nucleotídeo está bloqueada, e a cadeia de DNA termina naquele ponto. O didesoxi ATP (A *vermelho*) compete com um excesso de desoxi ATP normal (As *azuis*), de modo que ddATP é incorporado ocasionalmente, de forma aleatória, em uma cadeia de DNA crescente. Essa mistura de reação finalmente produzirá um grupo de DNAs de diferentes comprimentos complementares ao DNA-molde que está sendo sequenciado e terminando em cada um dos diferentes As (ver Figura 10-21). Apenas um dos vários produtos em potencial é mostrado aqui.

Figura 10-21 **O método didesoxi produz uma coleção de moléculas de DNA que diferem por um único nucleotídeo.** Para determinar a sequência completa de um fragmento de DNA, o DNA de fita dupla é primeiro separado nas suas fitas simples, e uma das fitas é utilizada como molde para o sequenciamento. Quatro trifosfatos de didesoxirribonucleosídeos terminadores de cadeia diferentes (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP novamente mostrados em *vermelho)* são utilizados em quatro reações separadas de síntese de DNA em cópias do mesmo molde de DNA de fita simples *(cinza)*. Cada reação produz um grupo de cópias de DNA que termina em diferentes pontos na sequência. Os produtos dessas quatro reações são separados por eletroforese em quatro canaletas paralelas de um gel de poliacrilamida (marcada aqui A, T, C e G). Os fragmentos recém-sintetizados são detectados por um marcador (radioativo ou fluorescente) que foi incorporado ou no iniciador ou em um dos trifosfatos de desoxirribonucleosídeos utilizados para estender a cadeia de DNA. Em cada canaleta, as bandas representam fragmentos que terminaram em um determinado nucleotídeo (p. ex., A na canaleta mais da esquerda), mas em diferentes posições no DNA. Pela leitura das bandas em ordem, iniciando no final do gel e trabalhando por todas as canaletas, a sequência de DNA da fita recém-sintetizada pode ser determinada. A sequência, que é dada na *seta verde* à direita do gel, é idêntica àquela da fita 5′ → 3′ *(verde)* do DNA de fita dupla original.

então aplicam, correm e leem a ordem das bases de nucleotídeos a partir do gel. Esse processo é facilitado pelo uso de nucleotídeos terminadores de cadeia, onde cada um é marcado com um agente fluorescente colorido diferente; todas as quatro reações de síntese podem assim ser realizadas no mesmo tubo, e os produtos podem ser separados em uma única canaleta de gel. Um detector posicionado perto do final do gel lê e grava a cor do marcador fluorescente em cada banda à medida que ela passa, e um computador armazena a sequência para uma análise subsequente (**Figura 10-22**). Como os pesquisadores podem montar uma sequência genômica completa a partir dessa informação, está descrito em **Como Sabemos**, p. 348-349.

Está claro que a obtenção da sequência de um gene ou de um genoma inteiro é apenas o início. Como discutimos no capítulo anterior, é um grande desafio observar uma sequência de nucleotídeos e determinar, por exemplo, onde um

Figura 10-22 **Hoje, o sequenciamento de DNA é totalmente automatizado.** Aqui é mostrada uma minúscula parte dos dados a partir de uma corrida de sequenciamento automático à medida que ela aparece na tela do computador. Cada pico colorido representa um nucleotídeo da sequência de DNA; uma extensão clara da sequência de nucleotídeos pode ser lida entre as posições 173 e 194 em relação ao início da sequência. Este exemplo é tomado do projeto internacional que determinou a sequência nucleotídica completa do genoma da planta *Arabidopsis thaliana*. (Cortesia de George Murphy.)

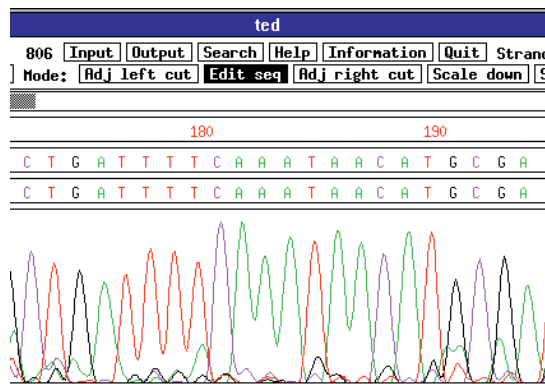



Figura 10-23 A clonagem seriada de DNA pode ser utilizada para unir um conjunto de fragmentos de DNA derivados a partir de fontes diferentes. Após cada passo de inserção de DNA, o plasmídeo recombinante é clonado para purificar e amplificar o novo DNA (ver Figura 10-10). A molécula recombinante é, então, cortada uma vez com uma nuclease de restrição, como indicado, e é utilizada como vetor de clonagem para o próximo fragmento de DNA.

gene inicia e termina, e quais partes são importantes para regular sua atividade. Mesmo com essa informação, não é necessariamente aparente qual o papel do gene na fisiologia de um organismo. Para isso, biólogos precisam manipular cada gene mais diretamente.

Moléculas de DNA completamente novas podem ser construídas

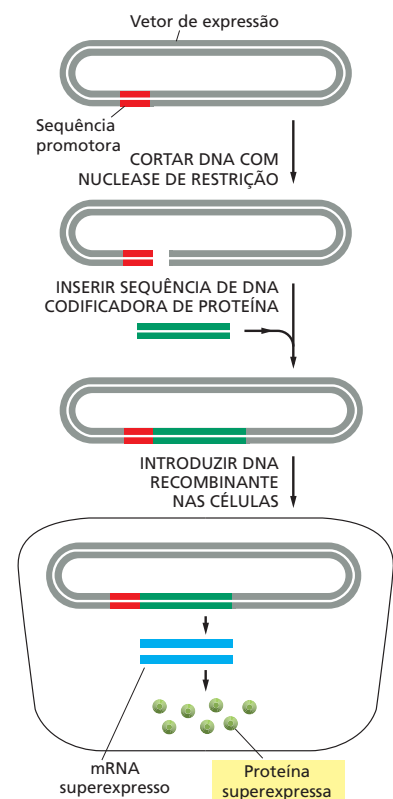
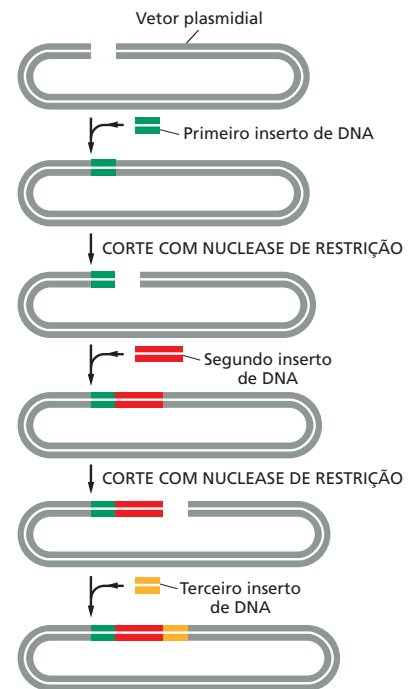
O estudo da função gênica normalmente envolve a construção de moléculas de DNA recombinante. Como já discutimos, tais moléculas recombinantes são geralmente feitas utilizando-se DNA-ligase para unir dois pedaços de DNA, incluindo DNA que provêm de diferentes organismos ou DNA que foi sintetizado quimicamente (ver Figura 10-6). Pela clonagem repetida de DNA, DNAs de qualquer fonte podem ser isolados e ligados em várias combinações para produzir moléculas de DNA de qualquer sequência desejada (**Figura 10-23**).

A habilidade para gerar moléculas de DNA solicitadas pelo pesquisador permite aos cientistas manipular genes em uma variedade de maneiras úteis. Eles podem introduzir mutações que alteram a atividade de um gene, uma abordagem que poderia revelar a função normal do gene. Eles também podem, por exemplo, alterar proteínas híbridas que contêm uma proteína marcadora fluorescente ligada à proteína de interesse. Tais fusões de proteínas permitem aos cientistas visualizar onde a proteína está localizada dentro da célula ou do organismo. Finalmente, em um dos usos mais práticos da tecnologia recombinante, os cientistas podem levar a uma produção de níveis muito maiores do que o normal de proteínas celulares raras, como veremos a seguir.

Proteínas raras podem ser sintetizadas em grandes quantidades utilizando DNA clonado

A maioria dos milhares de proteínas diferentes em uma célula eucariótica, incluindo várias com funções crucialmente importantes, está presente em quantidades muito pequenas. Para essas proteínas, costuma ser bastante difícil, senão impossível, obter quantidade suficiente delas na forma pura para serem estudadas. Uma das contribuições mais importantes da clonagem de DNA e da engenharia genética para biologia celular é que elas tornaram possível a produção de qualquer proteína, incluindo as raras, em quantidades quase que ilimitadas.

Essa alta produção normalmente é alcançada pela utilização de vetores especialmente projetados, conhecidos como *vetores de expressão.* Diferentes dos vetores de clonagem discutidos anteriormente, esses vetores também incluem sinais de transcrição e tradução apropriados, de modo que o gene inserido seja expresso em níveis muito altos (**Figura 10-24**). Diferentes vetores de expressão são projetados para uso em células bacterianas, de leveduras, de insetos ou de mamíferos, cada uma contendo as sequências reguladoras apropriadas

Figura 10-24 Grandes quantidades de uma proteína podem ser produzidas a partir de uma sequência de DNA que codifica para uma proteína clonada em um vetor de expressão e introduzida em células. Um vetor plasmidial foi projetado para conter um promotor bastante ativo, que faz com que quantidades anormais de mRNA sejam produzidas a partir de um gene adjacente que codifica para uma proteína inserido no vetor plamidial. Dependendo das características do vetor de clonagem, o plasmídeo é introduzido em células bacterianas, de leveduras, de insetos ou de mamíferos, onde o gene inserido é eficientemente transcrito e traduzido em proteína.

COMO SABEMOS:
SEQUENCIAMENTO DO GENOMA HUMANO

Quando as técnicas de sequenciamento de DNA se tornaram totalmente automatizadas, a determinação da ordem dos nucleotídeos em um pedaço de DNA deixou de ser um projeto de tese de doutorado elaborado para ser uma tarefa de rotina de laboratório. Alimentar o DNA na máquina de sequenciamento, adicionar os reagentes necessários e obter o resultado procurado: a ordem dos As, Ts, Gs e Cs. Nada poderia ser mais simples.

Então por que o sequenciamento do genoma humano foi uma tarefa tão formidável? Muito por causa do seu tamanho. Os métodos de sequenciamento atuais são limitados pelo tamanho físico do gel que é utilizado para separar os fragmentos marcados (ver Figura 10-21). Quando muito, apenas algumas centenas de nucleotídeos podem ser lidas a partir de um único gel. Como, então, você lidaria com um genoma que contém bilhões de nucleotídeos?

A solução é quebrar o genoma em fragmentos e sequenciar aqueles pedaços menores. O principal desafio, então, vem na montagem dos fragmentos curtos na ordem correta para gerar uma sequência ampla de um cromossomo inteiro e por fim todo um genoma. Para realizar essa quebra e remontagem, pesquisadores têm geralmente adotado duas estratégias diferentes para sequenciar genomas: o método aleatório e a abordagem clone por clone.

Sequenciamento aleatório (*shotgun*)

A abordagem mais avançada para sequenciar um genoma é quebrá-lo em fragmentos aleatórios, sequenciar cada um dos fragmentos e, então, utilizar um computador potente para ordenar esses pedaços utilizando sobreposições de sequências para guiar a montagem (**Figura 10-25**). Essa abordagem é chamada de "estratégia do sequenciamento aleatório". Como analogia, imagine rasgar várias cópias do *Fundamentos da biologia celular (FBC)* em pequenos pedaços, misturá-los e então tentar colocar um capítulo inteiro do livro de volta na ordem pela combinação das palavras, frases ou sentenças que aparecem em diferentes tiras estreitas de papel. (Várias cópias seriam necessárias para gerar a sobreposição necessária para a remontagem.) Isso poderia ser feito, mas seria muito mais fácil se o livro fosse do tamanho de, apenas, vamos dizer, duas páginas.

Figura 10-25 O sequenciamento aleatório é o método de escolha para sequenciar pequenos genomas. Primeiro, o genoma é quebrado em fragmentos sobrepostos muito menores. Cada fragmento é então sequenciado, e o genoma é montado com base nas sequências que se sobrepõem.

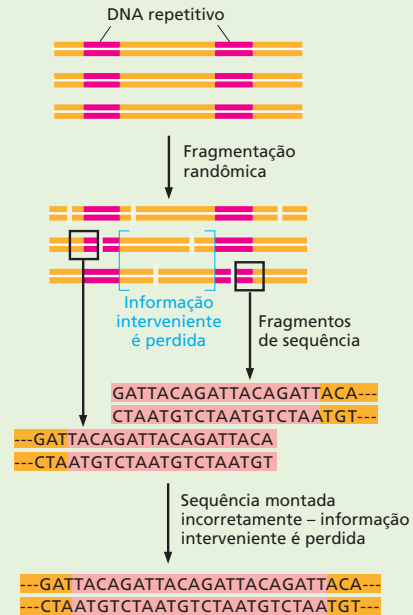



Figura 10-26 Sequências repetitivas tornam a remontagem correta difícil. Nesse exemplo, o DNA contém dois segmentos de DNA repetitivos, cada um feito de várias cópias da sequência GATTACA. Quando as sequências resultantes são analisadas, dois fragmentos a partir de duas partes diferentes do DNA parecem sobrepor-se. A montagem incorreta dessas sequências resultaria na perda de informação (entre parênteses) que está entre as repetições originais.

Por essa razão, uma abordagem aleatória direta é a estratégia de escolha para sequenciar pequenos genomas. Esse método provou o seu valor em 1995, quando foi utilizado para sequenciar o genoma da bactéria infecciosa *Haemophilus influenzae,* o primeiro organismo a ter a sua sequência genômica completa determinada. O problema com o sequenciamento aleatório é que o processo de remontagem pode ficar confuso, com sequências repetitivas de nucleotídeos (**Figura 10-26**). Embora raras em bactérias, essas sequências fazem parte de uma grande fração dos genomas de vertebrados (ver Figura 9-29). Segmentos de DNA altamente repetitivos tornam difícil remontar de volta as sequências de DNA com acuidade. Retornando à analogia ao *FBC,* apenas este capítulo contém mais do que uma dúzia de exemplos da frase "o genoma humano". Imagine que uma tira estreita de papel do *FBC* rasgado contenha a informação "Então por que o sequenciamento do geno-

ma humano foi" (que aparece no início desta seção); outra contém a informação "o consórcio da sequência do genoma humano combinou o sequenciamento aleatório com uma abordagem clone por clone" (que aparece no próximo parágrafo). Você poderia estar tentado a unir esses dois fragmentos com base na frase sobreposta "o genoma humano". Entretanto, você concluiria com a sentença sem sentido: "Então por que o sequenciamento do consórcio do genoma humano combinou o sequenciamento aleatório com uma abordagem clone por clone". Você também perderia vários parágrafos de texto importantes que originalmente apareciam entre esses dois exemplos de "o genoma humano".

E isso é apenas nessa seção. A frase "o genoma humano" aparece em quase todos os capítulos deste livro. Essas repetições compõem o problema de colocar cada fragmento no seu contexto correto. Para evitar esses problemas de montagem, os pesquisadores no consórcio da sequência do genoma humano combinaram o sequenciamento aleatório com a abordagem clone por clone.

Clone por clone

Nessa abordagem, os pesquisadores iniciaram preparando uma biblioteca genômica. Eles quebraram o genoma humano em fragmentos que se sobrepunham, de 100 a 200 pares de quilobases de tamanho. Então, eles ligaram esses segmentos a BACs *(bacterial artificial cromossomes* – cromossomos bacterianos artificiais) e os inseriram na *E. coli.* (BACs são similares a plasmídeos bacterianos discutidos anteriormente neste capítulo, com exceção de que podem carregar pedaços de DNA muito maiores.) À medida que as bactérias se dividem, elas copiam os BACs, produzindo, dessa forma, uma coleção de fragmentos clonados que se sobrepõem (ver Figura 10-11).

Os pesquisadores, então, mapearam cada um desses fragmentos de DNA na sua posição correta no genoma. Para isso, os pesquisadores utilizaram enzimas de restrição para gerar uma "assinatura" de cada clone (**Figura 10-27**). As localizações dos sítios para as enzimas de restrição em cada fragmento permitiram aos pesquisadores montar um mapa de cada clone BAC sobre um mapa de restrição do genoma humano inteiro gerado previamente.

Sabendo as posições relativas dos fragmentos clonados, os pesquisadores selecionaram cerca de 30.000 BACs, cortaram cada um em fragmentos menores e determinaram a sequência de nucleotídeos de cada BAC separadamente utilizando o método aleatório. Eles puderam então montar a sequência genômica inteira colando as sequências de milhares de BACs individuais que cobrem o comprimento do genoma.

A beleza dessa abordagem é a relativa facilidade em determinar com precisão a que parte do genoma os fragmentos BAC pertencem. Essa etapa de mapeamento reduz a probabilidade de que regiões que contenham sequências repetitivas sejam montadas de forma incorreta, e ele praticamente elimina a possibilidade de que as sequências de diferentes cromossomos sejam unidas por engano. Retornando para a analogia com o livro-texto, a abordagem com base em BAC é semelhante a primeiro separar as suas cópias do *FBC* em páginas individuais e então rasgar cada página em uma pilha individual. Seria muito fácil montar o livro novamente quando uma pilha de fragmentos contém palavras da página 1, uma segunda pilha da página 2 e assim por diante. E, praticamente, não existe chance de se colar de forma errônea uma sentença da página 40 no meio de um parágrafo na página 412.

Agora tudo junto

A abordagem clone por clone produziu o primeiro esboço da sequência do genoma humano, em 2000, e a sequência completa, em 2004. Como o grupo de instruções que especifica todas as moléculas de RNA e de proteínas necessárias para construir um ser humano, essa cadeia de *bits* genéticos retém os segredos do desenvolvimento, da fisiologia e da medicina humana. A sequência humana também será de grande valor para pesquisadores interessados na comparação de genomas ou na fisiologia de outros organismos: ela facilitou a montagem de sequências de nucleotídeos de outros genomas de mamíferos – camundongos, ratos, cães e outros primatas. Ela também tornou possível a determinação das sequências de nucleotídeos de genomas de humanos individuais pelo fornecimento de uma moldura na qual as novas sequências podem simplesmente ser sobrepostas. Dessa forma, a sequência humana provavelmente é o único genoma de mamíferos a ser completado nessa forma detalhada e metódica. Graças ao projeto do genoma humano, estamos começando a vislumbrar o alto grau de diversidade molecular presente na nossa própria espécie.

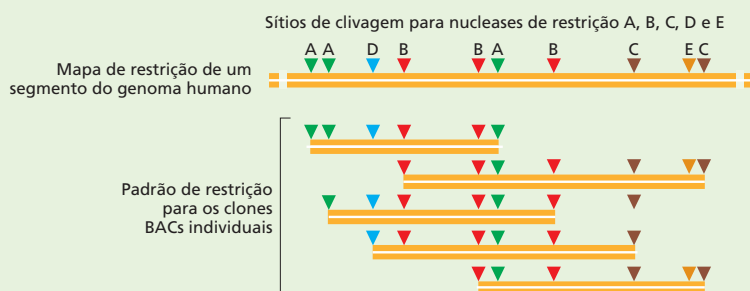



Figura 10-27 **Clones de BACs individuais estão posicionados no mapa físico da sequência do genoma humano com base nas suas "assinaturas" por digestão de restrição.** Os clones são digeridos com endonucleases de restrição, e os sítios nos quais as diferentes enzimas cortam cada clone são gravados. O padrão de distinção dos sítios de restrição permite aos investigadores ordenar os fragmentos e colocá-los sobre um mapa de restrição do genoma humano, gerado previamente.

para transcrição e tradução nessas células. O vetor de expressão é replicado a cada turno de divisão celular, dando origem a uma cultura de células capaz de sintetizar quantidades muito grandes da proteína de interesse. Como a proteína codificada pelo vetor de expressão normalmente é produzida dentro da célula, ela deve ser purificada das proteínas da célula hospedeira, após a lise, por cromatografia; mas, como ela é tão abundante no lisado celular (com frequência, compreendendo de 1-10% da proteína celular total), a purificação normalmente é fácil de ser alcançada em apenas poucas etapas.

Essa tecnologia agora também é usada para fornecer grandes quantidades de proteínas de utilidade na medicina. A proteína Fator VIII, por exemplo, agora é produzida comercialmente a partir de culturas de células de mamíferos modificadas geneticamente e, por isso, livre de contaminação viral. Várias outras proteínas úteis, incluindo hormônios (como a insulina), fatores de crescimento, agentes anticâncer e proteínas do capsídeo viral para uso em vacinas, também são produzidas dessa forma.

O uso de vetores de expressão também permite aos cientistas produzir várias proteínas de interesse biológico em quantidades suficientes para os estudos detalhados da estrutura e da função, que já foram impossíveis. Com grandes quantidades de uma proteína, os cientistas podem analisar sua atividade biológica ou bioquímica e talvez até mesmo formar cristais que seriam adequados para determinar a sua estrutura tridimensional por cristalografia por raios X (ver Como Sabemos, p. 158-160). As técnicas do DNA recombinante permitem aos cientistas iniciar com uma proteína de função desconhecida, isolar o gene que a codifica e obter proteína suficiente para ser capaz de investigar sua estrutura e atividade (**Figura 10-28**).

Genes repórteres e a hibridização *in situ* podem revelar onde e quando um gene é expresso

Nem a sequência nucleotídica completa de um gene nem mesmo a estrutura tridimensional da proteína é suficiente para deduzir a função de uma proteína, a não ser que ela seja intimamente relacionada com uma proteína cuja função já seja conhecida. Muitas proteínas – como aquelas que têm um papel estrutural na célula ou normalmente formam parte de um grande complexo multienzimático – não terão uma atividade bioquímica óbvia sobre elas mesmas. Mesmo aque-

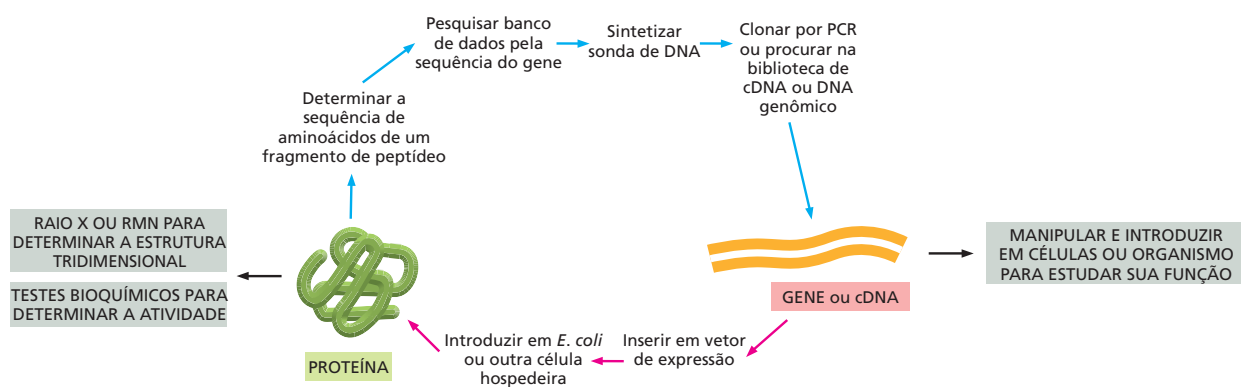



Figura 10-28 As técnicas de DNA recombinante tornam possível mover experimentalmente do gene para a proteína e da proteína para o gene. Uma pequena quantidade de uma proteína purificada é utilizada para obter uma sequência parcial de aminoácidos. Essa fornece uma informação da sequência que permite que o gene correspondente seja encontrado em uma biblioteca de DNA por hibridização de DNA (ver Figura 10-12) ou clonado e amplificado por PCR a partir de um genoma sequenciado (ver Figura 10-17). Uma vez que o gene tenha sido isolado e sequenciado, sua sequência codificante para proteína pode ser utilizada para desenhar uma molécula de DNA que então pode ser utilizada para produzir grandes quantidades da proteína a partir de células modificadas geneticamente (ver Figura 10-24). Essa proteína pode então ser estudada bioquímica ou estruturalmente. Além de produzir uma proteína, o gene ou DNA também pode ser manipulado e introduzido nas células ou organismos para estudar sua função.

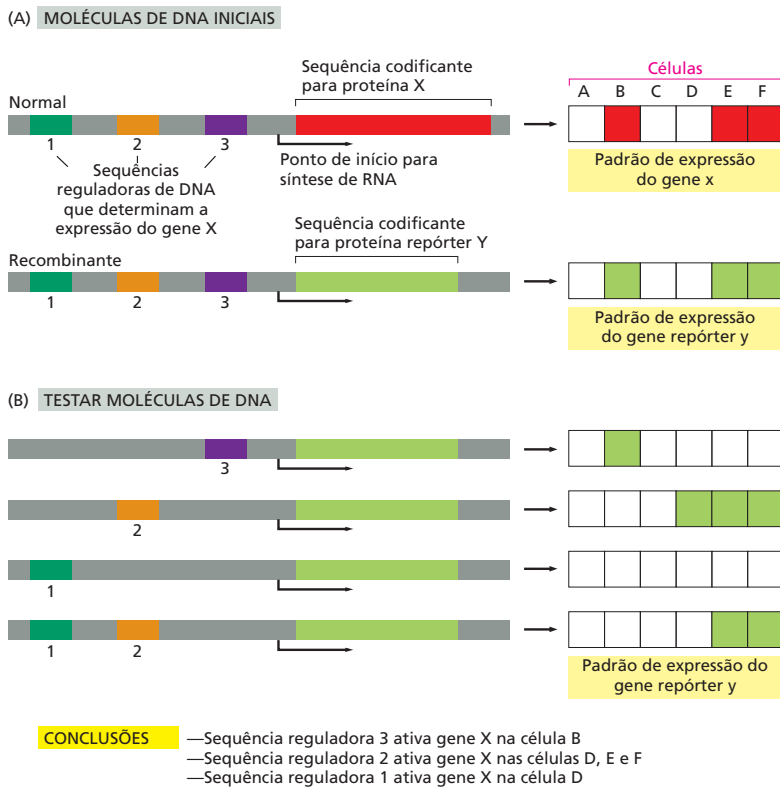



Figura 10-29 Genes repórteres podem ser utilizados para determinar o padrão de expressão de um gene. (A) Vamos supor que quiséssemos encontrar quais tipos de células expressam a proteína X, mas é difícil de detectar a proteína diretamente. A sequência codificante para a proteína X é substituída pela sequência codificante para a proteína repórter Y, que pode ser facilmente monitorada visualmente; por exemplo, a proteína Y pode ser fluorescente. A proteína Y agora será expressada sob controle das regiões reguladoras do gene X (aqui marcados 1, 2 e 3). (B) Para testar quais regiões reguladoras controlam a expressão em determinados tipos de células, são feitas várias combinações da região codificante Y e das regiões reguladoras. Essas moléculas de DNA recombinante são então testadas para expressão após sua introdução em diferentes tipos de células. Para experimentos em células eucarióticas, duas proteínas repórteres comumente utilizadas são as enzimas β-galactosidase (ver Figura 8-15C) e a proteína fluorescente verde (GFP) (ver Figura 10-30).

las que têm atividades conhecidas (proteína-cinases, por exemplo) poderiam, a princípio, participar em qualquer número de diferentes vias na célula; em outras palavras, nem sempre é claro, a partir das suas atividades biológicas, como as proteínas realmente são utilizadas pela célula.

Em vários casos, pistas para a função de uma proteína podem ser obtidas pela análise de quando e onde o seu gene é expressado na célula ou no organismo como um todo. A determinação do padrão e do momento da expressão de um gene pode ser obtida unindo-se a região reguladora do gene em estudo a um **gene repórter** – um cuja atividade possa ser facilmente monitorada. Como discutimos em detalhes no Capítulo 8, a expressão do gene é controlada por sequências de DNA reguladoras, normalmente localizadas acima da região codificante, que não são transcritas. Essas sequências reguladoras, que controlam quais células expressarão um gene e sob quais condições, também podem ser feitas para controlar a expressão de um gene repórter. O nível, o momento e a especificidade celular da produção das proteínas repórteres refletirão a função do gene original, assim como a ação das sequências reguladoras que pertencem a ele (**Figura 10-29**). Na maioria dos casos, a expressão do gene repórter é monitorada pelo rastreamento da fluorescência ou da atividade enzimática do seu produto proteico.

Uma das proteínas repórteres mais populares utilizadas atualmente é a **proteína fluorescente verde** (**GFP**, de *green fluorescent protein*), a molécula que dá às águas-vivas luminescentes o seu brilho esverdeado. Em vários casos, o gene da GFP pode simplesmente ser ligado a uma extremidade do gene que codifica para a proteína de interesse. Frequentemente, a *proteína de fusão com GFP* resultante se comporta da mesma forma que a proteína original, e a sua distribuição na célula ou no organismo pode ser facilmente monitorada, apenas seguindo sua fluorescência por microscopia (**Figura 10-30**). A estratégia da proteína de fusão com GFP se tornou uma maneira-padrão para determinar a distribuição

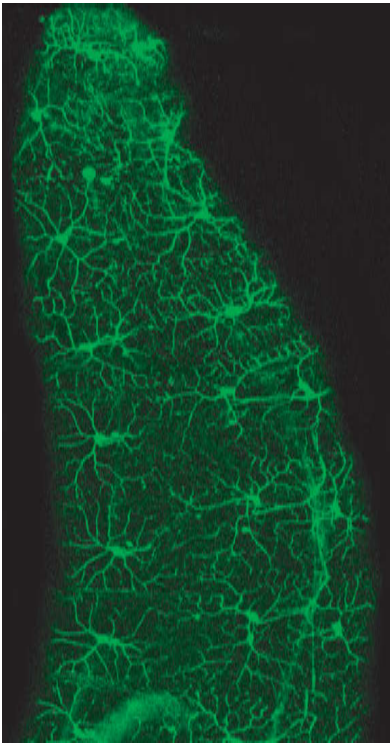
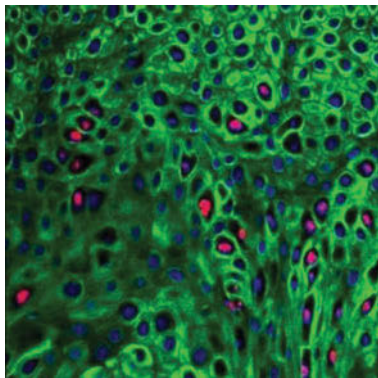



Figura 10-30 A proteína fluorescente verde (GFP) pode ser utilizada para identificar células específicas em um animal vivo. Para esse experimento, realizado na mosca-das-frutas, o gene para GFP foi unido (utilizando técnicas de DNA recombinante) a um promotor de mosca que é ativo apenas em um grupo especializado de neurônios. Essa imagem de um embrião vivo de mosca foi obtida por um microscópio de fluorescência e mostra aproximadamente 20 neurônios, cada um com longas projeções (axônios e dentritos) que se comunicam com outras células (não fluorescentes). Esses neurônios, localizados logo abaixo da superfície do embrião, permitem que o organismo perceba seu meio imediatamente. (De W. B. Grueber *et al*., *Curr. Biol*. 13:618-626, 2003. Com permissão de Elsevier.)

e para rastrear o movimento de qualquer proteína de interesse em um organismo vivo. A partir dessa informação, podem obter-se várias pistas sobre a função da proteína no organismo.

Também é possível observar diretamente o momento e o local em que o produto de mRNA de um gene é expressado. Na maioria dos casos, essa estratégia fornece a mesma informação geral da abordagem do gene repórter. Entretanto, em algumas situações, o monitoramento do RNA é o método de escolha: por exemplo, se o produto final do gene é RNA, em vez de proteína. Essa técnica, que tem como base os princípios da hibridização de ácidos nucleicos, descrita anteriormente, é chamada de **hibridização *in situ*** (do latim *in situ,* "no local"), pois permite que sequências específicas de ácidos nucleicos sejam localizadas enquanto ainda estiverem no local, dentro das células ou nos cromossomos.

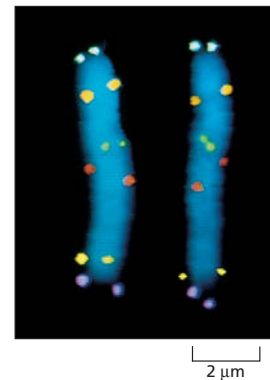
A hibridização *in situ* utiliza sondas de ácidos nucleicos, marcadas com corantes fluorescentes ou isótopos radioativos, para detectar a presença de RNA ou DNA de uma determinada sequência dentro de uma célula ou tecido (**Figura 10-31**). Essa técnica pode revelar os padrões de expressão gênica e tem levado a grandes avanços na nossa compreensão do desenvolvimento embrionário, por tornar facilmente visível as várias alterações na expressão gênica que ocorrem em diferentes células do embrião em desenvolvimento. A hibridização *in situ* também permite a visualização de sequências de DNA específicas dentro dos cromossomos. Nesse caso, as sondas são hibridizadas a cromossomos inteiros que foram expostos brevemente a um pH muito alto para separar as duas fitas de DNA. As regiões cromossomais que se ligam à sonda marcada podem então ser visualizadas (**Figura 10-32**). Essa técnica pode ser utilizada na medicina para identificar, no início da gestação, fetos que carregam cromossomos anormais.

A hibridização de microarranjos de DNA monitora a expressão de milhares de genes de uma só vez

Vimos no Capítulo 8 que uma célula expressa apenas um subgrupo dos genes disponíveis no seu genoma. Um dos usos mais importantes da hibridização dos ácidos nucleicos é determinar, para uma população de células, exatamente quais genes estão sendo transcritos em mRNA e quais genes são silenciosos transcricionalmente. Os métodos de hibridização *in situ* permitem aos cientistas monitorar a expressão de um gene – ou alguns genes – ao mesmo tempo. Entretanto, na década de 1990, os investigadores desenvolveram uma nova ferramenta, chamada de **microarranjo de DNA**, que permite que os produtos de RNA de dezenas de milhares de genes sejam monitorados ao mesmo tempo. Pela análise da expressão de tantos genes simultaneamente, podemos começar a identificar e a estudar os padrões complexos da expressão gênica que fundamentam a fisiologia celular, visualizando quais genes são ativados (ou desativados) à medida que a célula cresce, divide ou responde a hormônios, toxinas ou infecções.

Os microarranjos de DNA são um pouco mais do que lâminas de vidro simples de microscópio, crivadas com um grande número de fragmentos de DNA, cada um contendo uma sequência de nucleotídeos que serve como sonda para um gene específico. Os arranjos mais densos contêm centenas de milhares desses fragmentos em uma área menor do que a de um selo de correio, permitindo que os padrões de expressão de genomas inteiros sejam monitorados em um

Figura 10-31 A hibridização *in situ* pode ser utilizada para detectar a presença de um vírus nas células. Nessa micrografia, o núcleo de células epiteliais infectadas com o papilomavírus humano (HPV) está corado em *rosa* por uma sonda que reconhece uma sequência de DNA viral. O núcleo de todas as células está corado em *azul*, embora esse esteja mascarado pelo corante *rosa* nas células infectadas. O citoplasma de todas as células está corado em *verde*. (Cortesia de Hogne Røed Nilsen.)

Figura 10-32 A hibridização *in situ* é utilizada para localizar genes nos cromossomos. Aqui, seis sondas de DNA diferentes foram utilizadas para marcar a localização das suas sequências nucleotídicas respectivas no Cromossomo 5 humano isolado no estágio de metáfase da mitose (ver Figura 5-16 e Painel 18-1, p. 626-627). As sondas de DNA foram marcadas quimicamente e são detectadas utilizando anticorpos fluorescentes específicos para o marcador químico. Tanto as cópias maternas como paternas do Cromossomo 5 são mostradas, alinhadas lado a lado. Cada sonda produz dois pontos sobre cada cromossomo, porque cromossomos que estão sofrendo mitose já replicaram o seu DNA, e, portanto, cada cromossomo contém duas hélices de DNA idênticas. A técnica empregada aqui é chamada FISH (de, *fluorescence in situ hybridization* – hibridização *in situ* por fluorescência) (Cortesia de David C. Ward.)

único experimento. Alguns tipos de microarranjos carregam fragmentos de DNA que correspondem a genes inteiros que são colocados sobre lâminas por um robô. Outros tipos contêm moléculas de DNA de fita simples, curtas, que são sintetizadas sobre a superfície de uma pastilha de vidro utilizando técnicas similares àquelas que são usadas para gravar circuitos sobre *chips* de computador. Em cada caso, a sequência exata – e posição – de cada sonda de DNA sobre o *chip* é conhecida.

Para utilizar um microarranjo de DNA para monitorar simultaneamente a expressão de cada gene em uma célula, mRNA das células em estudo é extraído e convertido em cDNA (ver Figura 10-13). O cDNA é então marcado com uma sonda fluorescente. Esse microarranjo é incubado com a amostra de cDNA marcada e hibridizado (**Figura 10-33**). O arranjo é então lavado para remover moléculas não ligadas, e as posições nas quais os fragmentos de DNA marcados fluorescentemente hibridizaram, por pareamento de bases complementares, são identificadas por um microscópio automatizado. As posições nos arranjos são então comparadas aos genes particulares cujo DNA foi originalmente colocado em cada localização.

Microarranjos de DNA têm sido utilizados para examinar tudo, desde as mudanças na expressão gênica que fazem morangos amadurecerem até "assinaturas" genéticas de diferentes tipos de células de câncer humano. A comparação dos perfis da expressão gênica dos cânceres humanos, por exemplo, pode ser utilizada para prontamente distinguir um tipo de célula cancerosa da outra. Relacionando esses padrões de expressão com os dados clínicos obtidos para cada câncer – incluindo o quão rápido ele progride e se ele responde ao tratamento –, é possível predizer se um determinado paciente responderá a um tipo específico de terapia. Esses "perfis" de células cancerosas, com base em microarranjos, provavelmente conduzirão a tratamentos muito mais precisos e eficazes para essa doença, muitas vezes fatal.

As abordagens genéticas podem revelar a função de um gene

Ultimamente, os biólogos celulares desejam determinar como os genes, os RNAs e as proteínas codificadas por esses funcionam em um organismo in-

Figura 10-33 Microarranjos de DNA são utilizados para monitorar simultaneamente a expressão de vários milhares de genes. Neste exemplo, o mRNA é coletado a partir de duas amostras de célula diferentes para comparação direta dos seus níveis relativos de expressão gênica – por exemplo, células tratadas com um hormônio e células não tratadas do mesmo tipo. As amostras são convertidas em cDNA e marcadas, uma com um corante fluorescente vermelho e a outra com um corante fluorescente verde. As amostras marcadas são misturadas e, então, hibridizadas ao microarranjo. Após a incubação, o arranjo é lavado, e a fluorescência varrida. Apenas uma pequena porção do microarranjo é mostrada, representando 110 genes. Os pontos *vermelhos* indicam que o gene na amostra 1 é expressado em um nível mais alto do que o gene correspondente na amostra 2, e os pontos *verdes* indicam que a expressão do gene é mais vigorosa na amostra 2 do que na amostra 1. Os pontos *amarelos* revelam genes que são expressados em níveis iguais em ambas as amostras celulares. Os pontos escuros indicam pouca ou nenhuma expressão do gene cujo fragmento está localizado naquela posição no arranjo.

tacto. Antes do evento da clonagem gênica, as funções da maioria dos genes foram descobertas pela identificação e pelo estudo de organismos mutantes. Nessa abordagem genética "clássica", inicia-se isolando mutantes que têm uma aparência interessante ou incomum: moscas-das-frutas com olhos brancos ou asas enroladas, por exemplo. Trabalhando de trás para frente a partir desse **fenótipo** – a aparência ou o comportamento do indivíduo –, determina-se, então, o **genótipo** do organismo, a forma do gene responsável por aquela característica. A abordagem genética clássica é mais facilmente aplicável a organismos que se reproduzem de forma rápida e podem ser facilmente mutados no laboratório – como as bactérias, as leveduras, os vermes nematódeos e a mosca-das-frutas.

A tecnologia do DNA recombinante tornou possível um tipo diferente de abordagem genética. Em vez de começar com um mutante gerado aleatoriamente e utilizá-lo para identificar um gene e a sua proteína, pode-se começar com um gene clonado e produzir mutações nele *in vitro.* Então, pela reintrodução do gene alterado de volta no organismo do qual ele originalmente veio, pode-se produzir um organismo mutante no qual a função do gene poderá ser revelada. Utilizando as técnicas a serem discutidas brevemente, a sequência codificante de um gene clonado pode ser mudada para modificar as propriedades funcionais do produto proteico ou até mesmo eliminá-lo. Alternativamente, a região reguladora do gene pode ser modificada de modo que a quantidade de proteína produzida seja alterada ou de modo que o gene seja expresso em um tipo diferente de célula do que a normal, ou em um momento diferente durante o desenvolvimento.

A capacidade de manipular DNA *in vitro* torna possível a introdução de mutações precisas, e, dessa forma, os genes podem ser alterados de maneiras muito sutis. Frequentemente, deseja-se, por exemplo, modificar a proteína que o gene codifica em apenas um ou poucos aminoácidos. O uso da técnica de **mutagênese sítio-dirigida** para alcançar isso está resumido na **Figura 10-34**. Pela alteração de aminoácidos selecionados dessa forma, podemos determinar quais partes da cadeia polipeptídica são cruciais para tais processos fundamentais, como enovelamento das proteínas, interações entre proteínas e ligantes e catálise enzimática. Além disso, a mutagênese sítio-dirigida permite que se determine o papel biológico de cada parte de uma dada proteína.

QUESTÃO 10-5

Para realizar uma mutação *in vitro*, como mostrado na Figura 10-34, um erro é criado no DNA. Vocês espera que esse erro seja reconhecido e reparado por enzimas de reparo dos erros no DNA (ver Figura 6-22) quando o plasmídeo que contém o erro é introduzido nas células? Isso causaria um problema no procedimento de mutagênese sítio-dirigida? Explique suas respostas.

Os animais podem ser alterados geneticamente

Para estudar a função de um gene que foi mutado *in vitro,* idealmente seria preferível gerar um organismo no qual o gene normal fosse substituído por um alterado. Dessa forma, a função de uma proteína mutante pode ser analisada na ausência da proteína normal. Em vários organismos, tal **substituição gênica** pode ser obtida de maneira bastante fácil por recombinação homóloga entre o DNA mutante introduzido e o DNA cromossomal (**Figura 10-35A**). Com a mesma estratégia, o gene pode ser totalmente deletado, criando um **nocaute gênico** (Figura 10-35B). Uma terceira possibilidade é que o gene mutante pode ser adicionado ao genoma sem que qualquer alteração seja feita no gene normal no processo (Figura 10-35C). Os organismos nos quais um novo gene foi introduzido, ou aqueles cujo genoma tenha sido alterado de outras formas utilizando as técnicas de DNA recombinante, são conhecidos como **organismos transgênicos** ou *organismos geneticamente modificados* (*OGMs*).

Em organismos de reprodução sexuada, essas alterações normalmente são realizadas na linhagem germinativa, isto é, nas células reprodutoras. Tais animais transgênicos serão capazes de passar o gene alterado para, no mínimo, alguns da sua progênie como parte permanente do seu genoma (**Figura 10-36**). Tecnicamente, até mesmo a linhagem germinativa humana poderia agora ser alterada dessa forma, embora isso não seja permitido por uma variedade de razões éticas. Entretanto, técnicas similares estão sendo exploradas para corrigir defeitos genéticos nas células somáticas humanas. Células somáticas, como as células que formam fígado, pâncreas, ossos ou pele, reproduzem-se dentro de um ser humano, mas não são passadas adiante para a sua progênie (ver Figura 9-3). Algumas doenças

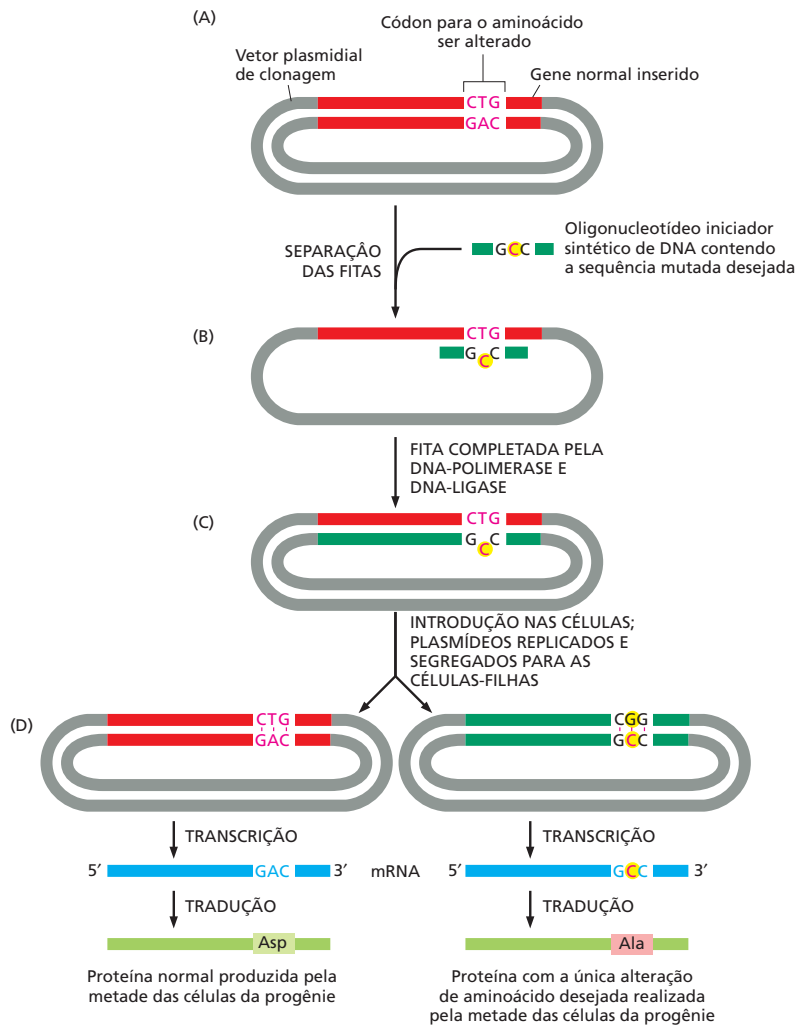



Figura 10-34 Moléculas de DNA sintéticas são utilizadas para modificar a região de um gene que codifica para a proteína, por mutagênese sítio-dirigida. (A) Um plasmídeo recombinante contendo um gene inserido é separado nas suas duas fitas de DNA. Um oligonucleotídeo iniciador sintético de DNA que contém um único nucleotídeo alterado em um ponto pré-determinado é adicionado ao DNA de fita simples sob condições que permitem menos do que uma hibridização de DNA perfeita. (B) O oligonucleotídeo hibridiza com o DNA, formando um único par incorreto de nucleotídeo. (C) O plasmídeo recombinante é produzido em fita dupla pela síntese *in vitro* de DNA, iniciando a partir do oligonucleotídeo iniciador e selado pela DNA-ligase. (D) O DNA de fita dupla é introduzido em uma célula, onde ele é replicado. A replicação de uma das fitas produz uma molécula de DNA normal, mas a replicação da outra (a fita que contém o oligonucleotídeo) produz uma molécula de DNA que carrega a mutação desejada. Apenas a metade das células da progênie terminará com um plasmídeo que contém o gene mutante desejado; entretanto, uma célula da progênie que contenha o gene mutado pode ser identificada, separada das outras células e cultivada para produzir uma população pura de células, das quais todas carregam o gene mutado. Com moléculas de DNA sintéticas da sequência apropriada, mais de uma substituição de aminoácido pode ser realizada de cada vez, ou um ou mais aminoácidos podem ser adicionados ou retirados.

genéticas poderiam ser aliviadas ou até mesmo curadas pela introdução de células somáticas corrigidas geneticamente nos tecidos mais afetados pela doença; entretanto, as alterações não seriam passadas para os descendentes.

As técnicas transgênicas tornam possível produzir organismos complexos que contêm genes alterados ou que não possuem certos genes inteiramente. Por exemplo, vários *camundongos nocauteados* – linhagens de camundongos que têm um determinado gene inativado permanentemente – foram produzidos. Observando-se o efeito da eliminação ou mutação de um dado gene, muitas vezes é possível inferir sua função normal (**Figura 10-37**).

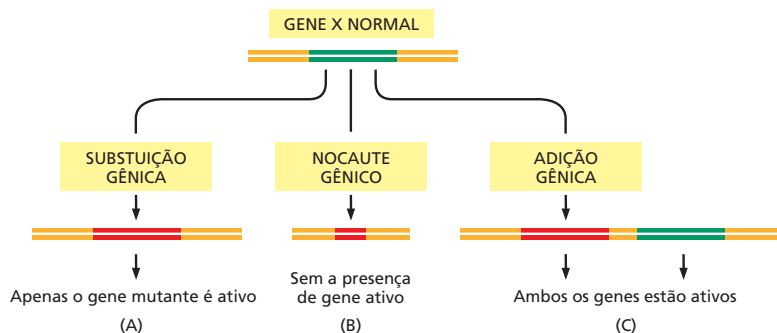
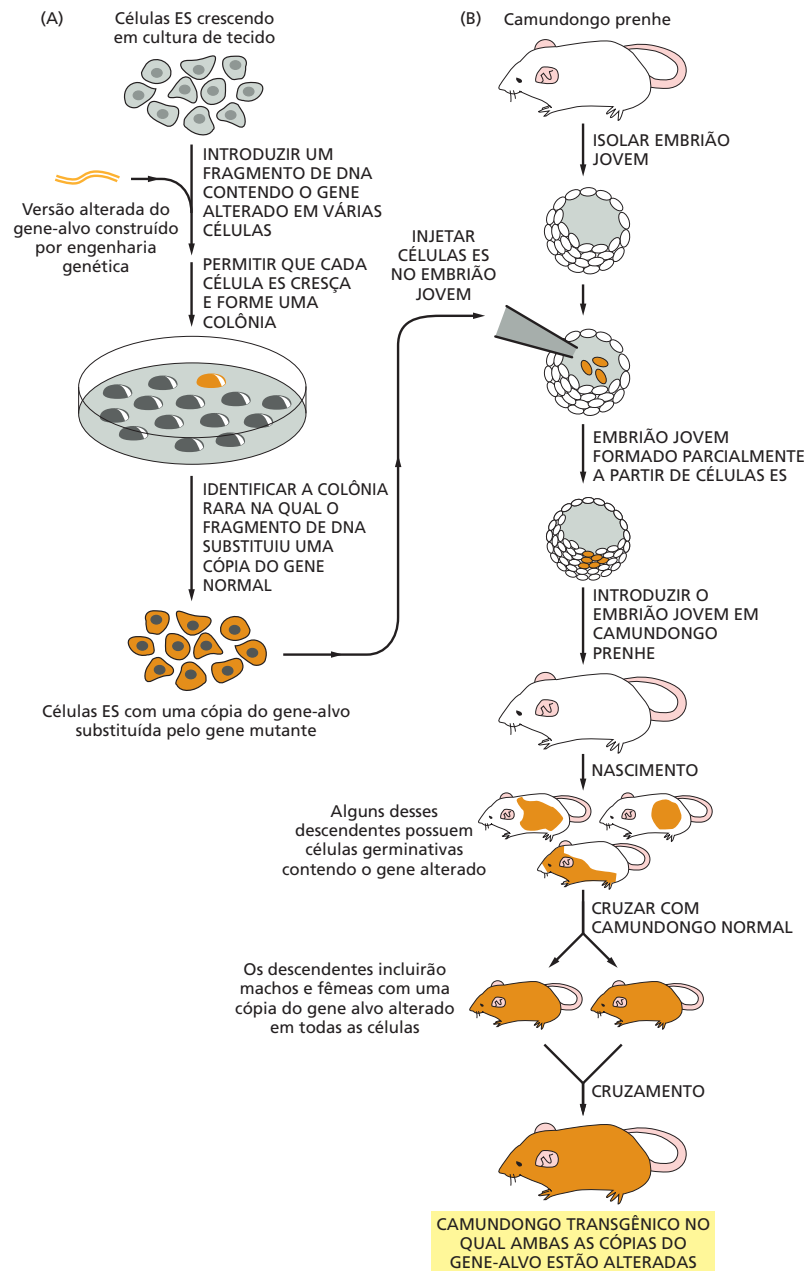



Figura 10-35 Vários tipos de alterações gênicas podem ser realizadas em organismos geneticamente modificados. (A) O gene normal pode ser completamente substituído por uma cópia mutante do gene, um processo chamado de substituição gênica. Isso fornecerá informações sobre a atividade do gene mutante, sem a interferência do gene normal, e, portanto, os efeitos de pequenas e sutis mutações podem ser determinados. (B) O gene normal pode ser inativado completamente, por exemplo, fazendo uma grande deleção nele; nesse caso, diz-se que o gene sofreu um nocaute. Esse tipo de alteração é amplamente utilizado para obter informações sobre a função do gene normal no animal inteiro. (C) Um gene mutante pode simplesmente ser adicionado ao genoma. Essa alteração pode fornecer informações úteis quando o gene mutante introduzido anula a função do gene normal.

Figura 10-36 A substituição gênica em camundongos utiliza células-tronco embrionárias (ES). Na primeira etapa (A), uma versão alterada do gene é introduzida nas células-tronco embrionárias (ES, de *embryonic stem* (ES) *cellls*) em cultura. Em algumas raras células ES, os genes normais correspondentes serão substituídos pelo gene alterado por recombinação homóloga. Embora o procedimento seja muitas vezes laborioso, essas células raras podem ser identificadas e cultivadas para produzir vários descendentes, e cada um carrega um gene alterado no lugar de um dos seus dois genes normais correspondentes. Na próxima etapa do procedimento (B), essas células ES alteradas são injetadas em um embrião de camundongo muito jovem; as células são incorporadas no embrião em crescimento, e um camundongo produzido por um embrião desses conterá algumas células somáticas (indicadas em *cor-de-laranja)* que carregam o gene alterado. Alguns desses camundongos podem conter células germinativas que contêm o gene alterado. Quando cruzado com um camundongo normal, parte da progênie desse camundongo conterá o gene alterado em todas as suas células. Se dois desses camundongos são, por sua vez, cruzados, parte da progênie conterá dois genes alterados (um em cada cromossomo) em todas as suas células. Se a modificação original do gene inativa completamente a função do gene, esses camundongos são chamados de camundongo "nocaute". Frequentemente, os camundongos, sem os genes que funcionam durante o desenvolvimento, morrem muito antes de alcançarem a idade adulta.

A interferência de RNA fornece uma maneira simples de testar a função gênica

Nocautear um gene em um organismo e estudar as consequências talvez seja a abordagem mais potente para compreender a função de um gene, mas existe uma maneira mais rápida e fácil de inativar genes em células e organismos. Chamado de **interferência de RNA** (**RNAi**), esse método explora um mecanismo natural utilizado em uma ampla variedade de plantas e animais para regular genes selecionados e destruir as moléculas de RNA "estranhas" (ver Figuras 8-26 e 8-27). A técnica se baseia na introdução, em uma célula ou organismo, de uma molécula de RNA de fita dupla cuja sequência de nucleotídeos forme pares com aquela do gene a ser inativado. Esse RNA de fita dupla é reconhecido como estranho, e a célula é enganada, não apenas degradando-o, mas também degradando o mRNA com a sequência que ele forma pares. Pequenos fragmentos

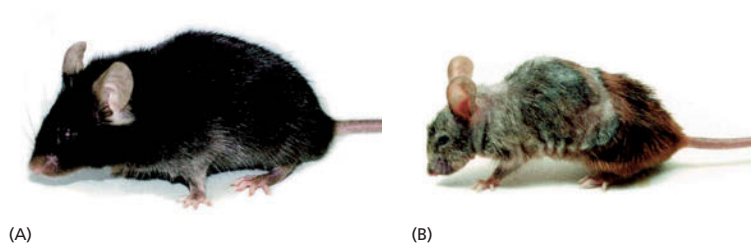



Figura 10-37 Camundongo transgênico com uma DNA-helicase mutante apresenta envelhecimento precoce. A helicase, codificada pelo gene *Xpd*, está envolvida tanto na transcrição quanto no reparo do DNA. Comparado com um camundongo do tipo selvagem (A), um camundongo transgênico que expressa uma versão defectiva de *Xpd* (B) exibe vários dos sintomas de envelhecimento precoce, incluindo osteoporose, emagrecimento, branqueamento precoce dos pelos, infertilidade e tempo de vida reduzido. A mutação em *Xpd* utilizada aqui diminui a atividade da helicase e mimetiza a mutação que nos humanos causa a tricotiodistrofia, um distúrbio caracterizado por cabelo quebradiço, anormalidades esqueléticas e uma perspectiva de vida muito reduzida. Esses resultados suportam a hipótese de que um acúmulo de danos no DNA contribui para o processo de envelhecimento tanto em humanos como em camundongos. (De J. de Boer *et al.*, *Science* 296:1276-1279, 2002. Com permissão de AAAS.)

desses RNAs degradados são subsequentemente utilizados pela célula para produzir mais RNA de fita dupla que direciona a eliminação contínua do mRNA-alvo. Como esses pequenos fragmentos de RNA podem ser passados para células da progênie, a RNAi pode causar alterações herdáveis na expressão gênica.

A RNAi é frequentemente utilizada para inativar genes em linhagens de células de mamíferos em cultura. Ela também tem sido amplamente usada para estudar a função de genes no nematódeo *C. elegans.* Quando trabalhamos com vermes, a introdução do RNA de fita dupla é simples: o RNA pode ser injetado diretamente no intestino do animal, ou o verme pode ser alimentado com *E. coli* modificada para produzir o RNA (**Figura 10-38**). O RNA é distribuído pelo corpo do verme, onde ele inibe a expressão do gene-alvo em diferentes tipos de tecido. Como o genoma inteiro de *C. elegans* foi sequenciado, o RNAi está sendo utilizado para auxiliar a determinar funções ao complemento inteiro de genes do verme.

As plantas transgênicas são importantes tanto para a biologia celular quanto para a agricultura

Embora a tendência seja pensar em pesquisa de DNA recombinante em termos de biologia animal, essas técnicas também têm um profundo impacto nos nossos estudos com plantas. Na verdade, certas características de plantas as tornam especialmente acessíveis para os métodos de DNA recombinante.

Quando um pedaço de tecido vegetal é cultivado em um meio estéril contendo nutrientes e reguladores de crescimento apropriados, algumas das células são estimuladas a proliferar indefinidamente de uma maneira desorganizada, produzindo uma massa de células relativamente indiferenciadas chamada de *calo.* Se os nutrientes e os reguladores do crescimento são cuidadosamente manipulados, pode-se induzir a formação de um broto dentro do calo, e em várias espécies, uma planta nova completa pode ser regenerada a partir dessas raízes. Em várias plantas – incluindo tabaco, petúnia, cenoura, batata e *Arabidopsis* –, uma única célula de um desses calos pode ser cultivada até um pequeno aglomerado de células a partir do qual uma planta completa pode ser regenerada (ver Figura 8-2B). Assim como um camundongo mutante pode ser originado por manipulação genética a partir de células-tronco embrionárias em cultura, as plan-

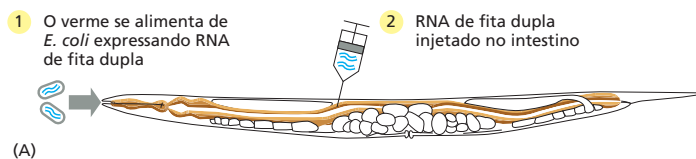



Figura 10-38 A função gênica pode ser testada por interferência de RNA. (A) RNA de fita dupla pode ser introduzido em *C. elegans* (1) alimentando os vermes com *E. coli* que expressam o RNA de fita dupla ou (2) injetando o RNA de fita dupla diretamente no intestino do animal. (B) Em um embrião do verme do tipo selvagem, os pronúcleos do óvulo e do espermatozoide (*setas vermelhas*) migram para a metade posterior do embrião logo após a fertilização. (C) Em um embrião no qual um determinado gene foi inativado por RNAi, os pronúcleos falham na migração. Esse experimento revelou uma função importante desse gene no desenvolvimento embrionário, antes desconhecida. (B e C, a partir de P. Gönczy *et al.*, *Nature* 408:331-336, 2000. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

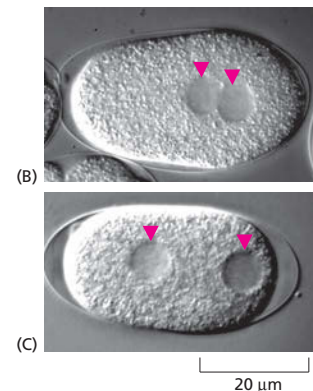
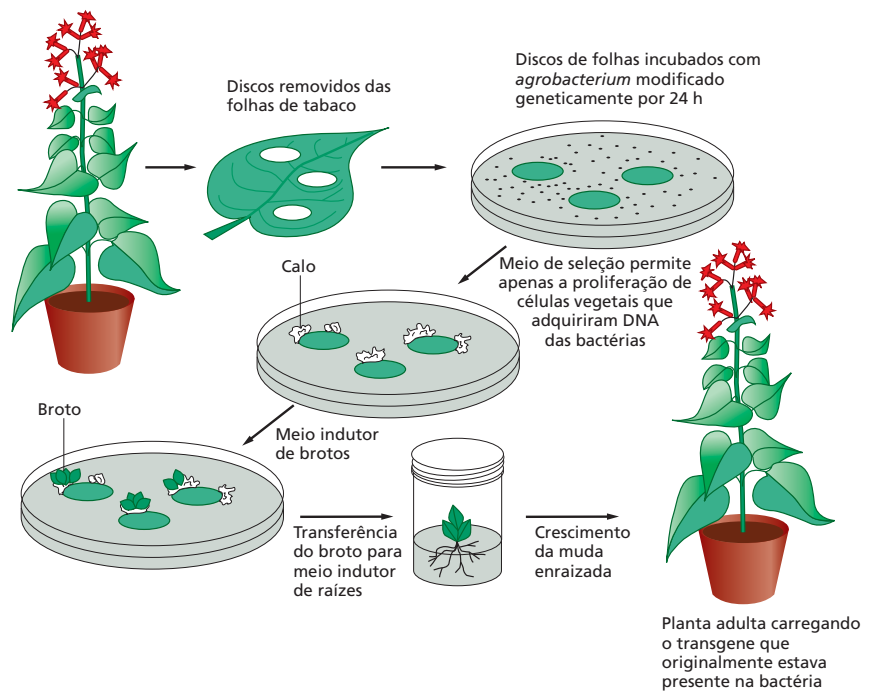



Figura 10-39 Plantas transgênicas podem ser produzidas utilizando técnicas de DNA recombinante. Um disco é cortado fora de uma folha e incubado em uma cultura de *Agrobacterium* na qual as células bacterianas carregam um plasmídeo recombinante com uma marca de seleção e um gene modificado desejado. As células lesionadas nas extremidades do disco liberam substâncias que atraem a bactéria e fazem com que elas injetem DNA nessas células. Apenas aquelas células vegetais que captam o DNA apropriado e expressam o gene do marcador de seleção sobrevivem para proliferar e formar o calo. A manipulação dos fatores de crescimento suplementados para o calo o induzem a formar brotos que, subsequentemente, formam raízes e crescem até plantas adultas carregando o gene modificado.

tas transgênicas podem ser criadas a partir de células vegetais transfectadas com DNA em cultura (**Figura 10-39**).

A capacidade para produzir plantas transgênicas acelerou muito o progresso em várias áreas da biologia celular de plantas. Ela tem uma parte importante, por exemplo, no isolamento de receptores para os reguladores do crescimento e na análise de mecanismos de morfogênese e da expressão gênica nas plantas. Essas técnicas também abriram várias novas possibilidades na agricultura que poderiam beneficiar tanto o produtor quanto o consumidor. Elas tornaram possível, por exemplo, modificar a relação entre lipídeo, amido e proteína nas sementes, conferir às plantas resistência a pestes e a vírus e criar plantas modificadas que toleram hábitats extremos, como pântanos salgados ou solos alagados. Uma variedade de arroz foi modificada geneticamente para produzir β-caroteno, o precursor da vitamina A. Caso esse arroz substituísse o arroz convencional, esse "arroz de ouro" – assim chamado pela sua cor levemente amarela – poderia aliviar a deficiência grave de vitamina A, que causa cegueira em centenas de milhares de crianças em desenvolvimento a cada ano no mundo.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- **A tecnologia de DNA recombinante revolucionou o estudo da célula, tornando possível, para pesquisadores, selecionar qualquer gene à vontade a partir de milhares de genes em uma célula e determinar a exata estrutura molecular do gene.**
- **Um elemento crucial nessa tecnologia é a capacidade para cortar uma grande molécula de DNA em um grupo específico e reproduzível de fragmentos de DNA utilizando nucleases de restrição, cada uma das quais cortando o DNA de dupla-hélice apenas em uma determinada sequência de nucleotídeos.**
- **Os fragmentos de DNA podem ser separados um dos outros com base no seu tamanho utilizando eletroforese em gel.**
- **A hibridização de ácidos nucleicos pode detectar qualquer sequência de DNA ou RNA em uma mistura de fragmentos de ácidos nucleicos. Essa**

técnica se baseia no fato de que uma fita simples de DNA ou RNA formará uma hélice de fita dupla apenas com outra fita de ácido nucleico da sequência nucleotídica complementar.

- DNAs de fita simples de sequências conhecidas e marcados com corantes fluorescentes ou radioisótopos são utilizadas como sondas nas reações de hibridização.
- Fitas curtas de DNA de qualquer sequência podem ser produzidas por síntese química no laboratório.
- As técnicas de clonagem de DNA permitem que uma sequência de DNA seja selecionada a partir de milhões de outras sequências e produzida em quantidade ilimitada, na forma pura.
- Fragmentos de DNA podem ser unidos *in vitro* utilizando DNA-ligase para formar moléculas de DNA recombinante não encontradas na natureza.
- Fragmentos de DNA podem ser mantidos e amplificados por meio da sua inserção em uma molécula de DNA capaz de replicar-se, como um plasmideo. Essa molécula de DNA recombinante é, então, introduzida em uma célula hospedeira que se divide rapidamente, em geral uma bactéria, de modo que o DNA é replicado a cada divisão celular.
- Uma coleção de fragmentos clonados de DNA cromossomal, representando o genoma completo de um organismo, é conhecida como biblioteca genômica. A biblioteca é frequentemente mantida como milhões de clones de bactérias, cada clone carregando um fragmento diferente de DNA.
- Bibliotecas de cDNA contêm cópias de DNA clonado do mRNA total de um determinado tipo de célula ou tecido. Diferente dos clones de DNA genômico, cDNAs clonados contêm predominantemente sequências que codificam para proteínas; eles não possuem íntrons, sequências de DNA regulatórias nem promotores. Por essa razão, elas são mais apropriadas para o uso quando o gene clonado é para ser expressado para produzir uma proteína.
- A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma forma potente de amplificação de DNA que é realizada *in vitro,* utilizando uma DNA-polimerase purificada. A PCR requer um conhecimento prévio da sequência a ser amplificada, pois dois oligonucleotídeos iniciadores sintéticos que delimitam a porção de DNA a ser replicada devem ser sintetizados.
- Historicamente, os genes eram clonados utilizando técnicas de hibridização para identificar o plasmídeo que carregava a sequência desejada a partir de uma biblioteca de DNA. Atualmente, a maioria dos genes são clonados utilizando a PCR para amplificá-los, de forma a obter uma sequência específica a partir de uma amostra de DNA ou mRNA.
- Atualmente estão disponíveis técnicas para determinação rápida da sequência de nucleotídeos de qualquer pedaço de DNA.
- As sequências nucleotídicas completas dos genomas de centenas de organismos diferentes têm sido determinadas. Essas incluem bactérias, Archaea, leveduras, insetos, peixes, plantas e mamíferos.
- Bactérias, leveduras e células de mamíferos podem ser modificadas para sintetizar grandes quantidades de qualquer proteína a partir de qualquer organismo, tornando possível o estudo de proteínas que de outra maneira são raras ou difíceis de isolar.
- Com o uso das técnicas de DNA recombinante, uma proteína pode ser ligada a um marcador molecular, como uma proteína fluorescente verde (GFP), que permite rastrear os seus movimentos dentro da célula. No caso da GFP, a proteína pode ser monitorada com o passar do tempo em organismos vivos.
- A hibridização *in situ* de ácidos nucleicos pode ser utilizada para detectar a localização precisa de genes nos cromossomos, ou de RNAs em células e tecidos.

- **Por ofertarem uma plataforma para realização de uma grande quantidade de reações de hibridização simultâneas, os microarranjos de DNA podem ser utilizados para monitorar a expressão de dezenas de milhares de genes de uma só vez.**
- **Genes clonados podem ser inseridos permanentemente no genoma de uma célula ou de um organismo utilizando a tecnologia do DNA recombinante. O DNA clonado pode ser alterado *in vitro* para criar genes mutantes que podem então ser reinseridos em uma célula ou organismo para estudar a função gênica.**
- **Uma estratégia direta para estudar a função de um gene é apagá-lo do genoma do organismo e então estudar o efeito do seu nocaute sobre o comportamento ou a aparência do organismo.**
- **A expressão de determinados genes pode ser inibida em células ou organismos pela técnica de interferência de RNA (RNAi), que previne que o mRNA seja traduzido em proteína.**

TERMOS-CHAVE

biblioteca de DNA
cDNA
clonagem de DNA
DNA-ligase
DNA recombinante
fenótipo
gene repórter
genótipo
hibridização
hibridização *in situ*
interferência de RNA (RNAi)
microarranjo de DNA
mutagênese sítio-dirigida
nocaute gênico
nuclease de restrição
organismo transgênico
plasmídeo
proteína fluorescente verde (GFP)
reação em cadeia da polimerase (PCR)
sequenciamento didesoxi de DNA
substituição gênica
tecnologia de DNA recombinante
transformação

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 10-6

Quais são as consequências para uma reação de sequenciamento de DNA se a proporção entre trifosfatos de didesoxirribonucleosídeo e trifosfatos de desoxirribonucleosídeo for aumentada? O que aconteceria se essa proporção fosse diminuída?

QUESTÃO 10-7

Quase todas as células em um animal contêm genomas idênticos. Em um experimento, um tecido composto de vários tipos diferentes de células é fixado e submetido à hibridização *in vitro* com uma sonda de DNA para um determinado gene. Para sua surpresa, o sinal de hibridização é muito mais forte em algumas células do que em outras. Como você poderia explicar esse resultado?

QUESTÃO 10-8

Após décadas de trabalho, o Dr. Ricky M. isolou uma pequena quantidade de atratase – uma enzima que produz um feromônio humano potente – a partir de amostras de cabelo de celebridades de Hollywood. Para tomar vantagem da atratase para seu uso pessoal, ele obteve um clone genômico completo do gene para atratase, conectado a um forte promotor bacteriano em um plasmídeo de expressão e introduziu o plasmídeo em células de *E. coli*. Ele ficou desolado ao perceber que nenhuma atratase fora produzida pelas células. Qual é a possível explicação para a falha?

QUESTÃO 10-9

Quais das seguintes afirmações estão corretas? Explique as suas respostas.

A. Nucleases de restrição cortam o DNA em sítios específicos que estão sempre localizados entre os genes.
B. O DNA migra em direção ao eletrodo positivo durante a eletroforese.
C. Clones isolados a partir de bibliotecas de cDNA contêm sequências promotoras.
D. A PCR utiliza uma DNA-polimerase termoestável, porque, para cada etapa de amplificação, o DNA de fita dupla deve ser desnaturado por calor.
E. A digestão do DNA genômico com AluI, uma enzima de restrição que reconhece uma sequência de quatro nucleotídeos, produz fragmentos que possuem exatamente 256 nucleotídeos de comprimento.
F. Para fazer uma biblioteca de cDNA, tanto uma DNA-polimerase como uma transcriptase reversa devem ser utilizadas.
G. A impressão digital do DNA por PCR se baseia no fato de que indivíduos diferentes têm diferentes números de repetições nas regiões STR no seu genoma.

H. É possível para uma região codificante de um gene estar representada em uma biblioteca genômica preparada a partir de um determinado tecido, mas não estar representada em uma biblioteca de cDNA preparada a partir do mesmo tecido.

QUESTÃO 10-10

A. Determine a sequência do DNA que foi utilizada na reação de sequenciamento exibida na **Figura Q10-10**. As quatro canaletas mostram os produtos das reações de sequenciamento que continham ddG (canaleta 1), ddA (canaleta 2), ddT (canaleta 3) e ddC (canaleta 4). Os números à direita da autorradiografia representam as posições dos fragmentos de DNA de 50 e 116 nucleotídeos.

B. O DNA derivou do meio de um clone de cDNA de uma proteína de mamífero. Utilizando a tabela do código genético (ver Figura 7-24), você pode determinar a sequência de aminoácidos dessa porção da proteína?

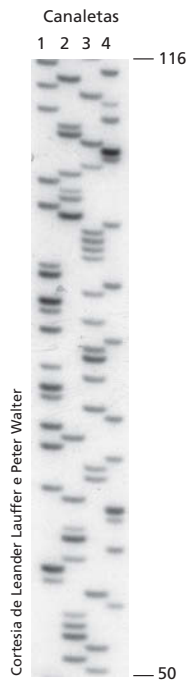



Figura Q10-10

QUESTÃO 10-11

A. Quantos fragmentos de DNA diferentes você esperaria obter se você clivasse DNA genômico humano com HaeIII? (Relembre que existem 3×10^9 pares de nucleotídeos por genoma haploide.) Quantos fragmentos você esperaria com EcoRI? E com NotI?

B. Bibliotecas genômicas humanas utilizadas para sequenciamento de DNA frequentemente são feitas de fragmentos obtidos pela clivagem de DNA humano com HaeIII, de modo que o DNA é apenas clivado parcialmente, isto é, nem todos os sítios para HaeIII foram clivados. Qual seria a possível razão para se fazer isso?

QUESTÃO 10-12

Uma molécula de DNA de fita dupla foi clivada com três nucleases de restrição diferentes, e os produtos resultantes foram separados por eletroforese em gel (**Figura Q10-12**). Os fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos foram submetidos à eletroforese no mesmo gel para serem usados de marcador de tamanho (canaleta da *esquerda*). O tamanho dos marcadores de DNA é dado em pares de quilobases (kb), onde 1 kb = 1.000 pares de nucleotídeos. A utilização de marcadores de tamanho como guia estima o tamanho de cada fragmento de restrição obtido. A partir dessas informações, deduza um mapa da molécula original de DNA que indica as posições relativas de todos os sítios de clivagem das enzimas de restrição.

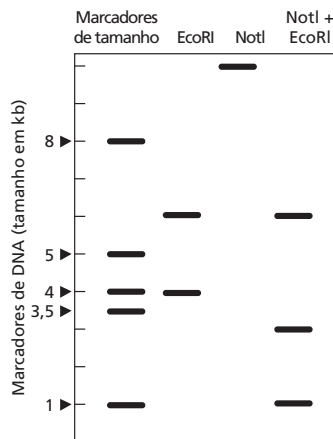



Figura Q10-12

QUESTÃO 10-13

Você isolou uma pequena quantidade de proteína rara. Você clivou a proteína em fragmentos utilizando proteases, separou alguns dos fragmentos por cromatografia e determinou a sua sequência de aminoácidos. Infelizmente, como frequentemente é o caso quando apenas pequenas quantidades de proteína estão disponíveis para iniciar, você obteve apenas três extensões curtas da sequência de aminoácidos da proteína:

1. Trp-Met-His-His-Lys
2. Leu-Ser-Arg-Leu-Arg
3. Tyr-Phe-Gly-Met-Gln

A. Utilizando o código genético (ver Figura 7-24), desenhe uma coleção de sondas de DNA específicas para cada peptídeo que poderiam ser utilizadas para detectar o gene em uma biblioteca de cDNA por hibridização. Qual dessas três coleções de sondas de oligonucleotídeos seria preferível para usar primeiro? Explique a sua resposta. (Dica: o código genético é redundante, assim cada peptídeo possui múltiplas sequências codificantes em potencial.)

B. Você também foi capaz de determinar que Gln do seu peptídeo nº 3 é o aminoácido C-terminal (isto é, o final) da sua proteína. Como você faria para desenhar oligonucleotídeos iniciadores que poderiam ser utilizados para amplificar uma porção do gene a partir de uma biblioteca de cDNA utilizando PCR?

C. Suponha que a amplificação por PCR em (B) gerou um DNA que tem precisamente 300 nucleotídeos de comprimento. Após determinar a sequência de nucleotídeos desse DNA, você encontrou a sequência CTATCACGCTTTAGG aproximadamente no meio. O que você concluiria a partir dessas observações?

QUESTÃO 10-14

Assuma que uma reação de sequenciamento de DNA é realizada como mostrado na Figura 10-21, exceto que os quatro trifosfatos de didesoxirribonucleosídeo diferentes são modificados de modo que cada um contenha um corante de cor diferente ligado covalentemente (o que não interfere na sua incorporação na cadeia de DNA). Quais seriam os produtos se você adicionasse uma mistura dos quatro desses trifosfatos de didesoxirribonucleosídeo marcados juntamente com os quatro trifosfatos de desoxirribonucleosídeo não marcados em uma única reação de sequenciamento? Como os resultados se pareceriam se você submetesse esses produtos à eletroforese em uma única canaleta de um gel?

QUESTÃO 10-15

Clones de DNA genômico são frequentemente utilizados para "andar" ao longo do cromossomo. Nessa abordagem, um DNA clonado é utilizado para isolar outros clones que contêm sequências de DNA sobrepostas (**Figura Q10-15**). Utilizando esse método, é possível montar um segmento da sequência de DNA e, dessa forma, identificar novos genes próximos a um gene clonado previamente.

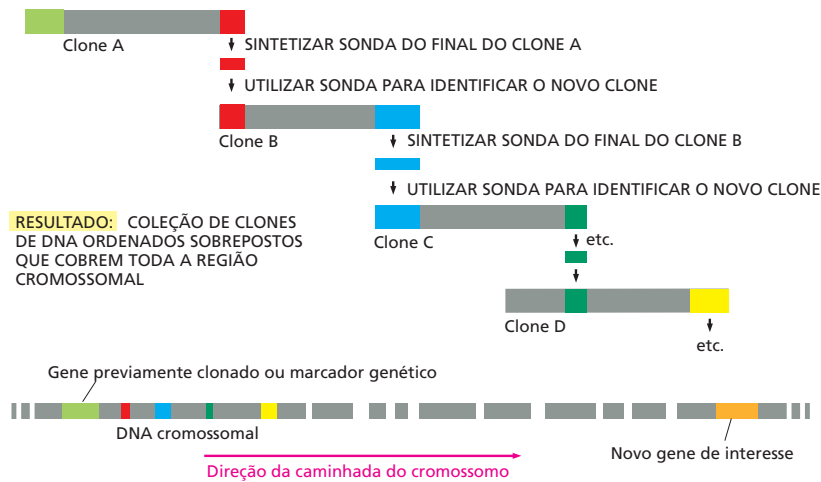



Figura Q10-15

Figura Q10-16

A. Seria mais rápido usar clones de cDNA nesse método, porque eles não contêm qualquer sequência de íntron?

B. Quais seriam as consequências se você encontrasse uma sequência repetitiva de DNA, como o transpóson L1 (ver Figura 6-35), que é encontrado em várias cópias e em vários locais diferentes no genoma?

QUESTÃO 10-16

Ocorreu uma situação muito confusa na ala da maternidade no seu hospital local. Quatro grupos de meninos gêmeos, nascidos dentro de uma hora, foram misturados inadvertidamente na excitação ocasionada pelo evento improvável. Você foi chamado para corrigir as coisas. Como primeiro passo, você quer parear os gêmeos. (Vários recém-nascidos se parecem, portanto, você não iria querer basear-se apenas na aparência.) Para isso, você analisa uma pequena amostra de sangue de cada criança utilizando uma sonda para hibridização que detecta repetições curtas *in tandem* (STRs) localizadas em regiões amplamente dispersas do genoma. Os resultados são mostrados na **Figura Q10-16**.

A. Quais crianças são irmãos? Quais são gêmeos idênticos?

B. Como você poderia parear o par de irmãos aos pais corretos?

QUESTÃO 10-17

Um dos primeiros organismos que foi modificado geneticamente utilizando a tecnologia do DNA recombinante foi uma bactéria que normalmente vive na superfície de plantas do morango. Essa bactéria sintetiza uma proteína, chamada de proteína-gelo, que causa a formação eficiente de cristais de gelo ao seu redor quando a temperatura cai um pouco abaixo do congelamento. Dessa forma, morangos que carregam essa bactéria são particularmente suscetíveis ao dano pela geada, porque as suas células são destruídas pelos cristais de gelo. Consequentemente, produtores de morangos têm um interesse considerável na prevenção da cristalização do gelo.

Uma versão modificada geneticamente dessa bactéria foi construída, na qual o gene para a proteína do gelo foi nocauteado. A bactéria mutante foi então introduzida em grandes quantidades nas lavouras de morango, onde elas deslocaram a bactéria normal por competição pelo seu nicho ecológico. Essa abordagem tem sido bem-sucedida: morangos que carregam a bactéria mutante mostraram uma suscetibilidade reduzida ao dano pela geada.

Quando os testes iniciais de campo foram realizados pela primeira vez, eles desencadearam um intenso debate, pois representavam a primeira liberação para o meio de um organismo que foi geneticamente modificado utilizando tecnologia de DNA recombinante. Na verdade, todos os experimentos preliminares foram realizados com cuidados extremos e em restrições rigorosas (**Figura Q10-17**).

Você acha que bactérias sem a proteção contra o gelo poderiam ser isoladas sem o uso da tecnologia moderna de DNA? É possível que tais mutações já tenham ocorrido na natureza? O uso de uma cepa bacteriana mutante isolada da natureza causaria menor preocupação? Deveríamos estar preocupados sobre os riscos apresentados pela aplicação das técnicas de DNA recombinante na agricultura e na medicina? Explique as suas respostas.

Figura Q10-17

A Estrutura das Membranas

Uma célula viva é um sistema de moléculas autorreplicativas mantidas no interior de um envoltório. Esse envoltório é a **membrana plasmática** – um filme lipídico tão fino e transparente que não pode ser visto diretamente pelo microscópio óptico. Toda célula na Terra utiliza uma membrana para separar e proteger seus constituintes químicos do ambiente externo. Sem membranas, não haveria células, e consequentemente não haveria vida.

A membrana plamática é simples na sua forma: a sua estrutura se baseia em uma bicamada de moléculas lipídicas, com espessura aproximada de 5 nm – ou 50 átomos. Suas propriedades, porém, diferem das de qualquer outra bicamada constituída por outros materiais que estamos familiarizados no nosso cotidiano. Apesar de servir como uma barreira para evitar a perda ou a mistura de componentes celulares com o meio circundante (**Figura 11-1A**), a membrana plasmática faz muito mais do que isso. Para uma célula sobreviver e crescer, nutrientes precisam atravessar a membrana plasmática de fora para dentro, assim como resíduos devem ser eliminados. Para facilitar essas trocas, a membrana possui canais altamente seletivos e bombas – proteínas de

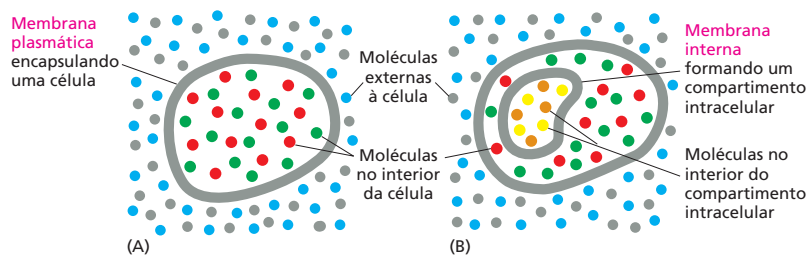
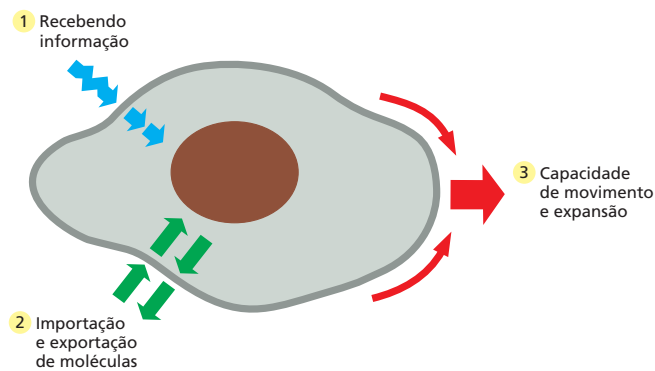



Figura 11-1 **Membranas celulares funcionam como barreiras seletivas.** (A) A membrana plasmática separa a célula do ambiente externo e é a única membrana presente na maioria das células bacterianas. A membrana permite que a composição molecular da célula seja distinta da composição do ambiente em que a célula se encontra. (B) Nas células eucarióticas, membranas internas adicionais encapsulam organelas individualmente. Nesses dois casos, a membrana evita que as moléculas presentes em um compartimento se misturem a moléculas presentes em outro compartimento.

Figura 11-2 A membrana plasmática está envolvida na comunicação celular, na importação e exportação de moléculas, no crescimento celular e na sua mobilidade. (1) Proteínas receptoras presentes na membrana plasmática permitem que a célula receba sinais do seu ambiente; (2) proteínas de transporte presentes na membrana permitem a importação e exportação de pequenas moléculas; (3) a flexibilidade da membrana e a sua capacidade de expandir-se permitem à célula crescer e movimentar-se.

membrana que permitem a importação de substâncias específicas enquanto outras são exportadas da célula. Outras proteínas de membrana funcionam como sensores que permitem à célula receber informações sobre mudanças no seu ambiente e responder a essas mudanças (**Figura 11-2**). As propriedades mecânicas da membrana são igualmente notáveis. Quando uma célula cresce ou muda de forma, sua membrana também o faz: ela aumenta sua área pela adição de novos segmentos de membrana sem que ocorra perda da sua continuidade, e ela pode deformar-se sem se romper. Se a membrana é perfurada, ela não colapsa como um balão nem permanece rompida, ela rapidamente sela o local da perfuração.

A bactéria mais simples possui uma única membrana – a membrana plasmática. Células eucarióticas, porém, contêm também uma profusão de *membranas internas* que delimitam compartimentos intracelulares, formando diversas organelas, incluindo o retículo endoplasmático, o aparelho de Golgi e a mitocôndria (**Figura 11-3**). Essas membranas internas são construídas com os mesmos princípios que a membrana plasmática e servem também como barreiras altamente seletivas entre os espaços que contêm moléculas distintas (ver Figura 11-1B). Diferenças sutis na composição dessas membranas, especialmente quanto às proteínas que as compõem, conferem a cada organela suas características distintas.

Independentemente da sua localização, todas as membranas celulares são compostas por lipídeos e proteínas e dividem uma estrutura geral comum (**Figura 11-4**). Os componentes lipídicos estão arranjados em duas lâminas justapostas, formando a *bicamada lipídica* (ver Figura 11-4 B e C). Essa bicamada lipídica confere à membrana sua estrutura básica e funciona como uma barreira permeável à maioria das moléculas solúveis em água. Proteínas medeiam a maioria das demais funções da membrana e conferem características específicas a diferentes membranas.

Neste capítulo, consideraremos a estrutura e a organização dos dois principais constituintes das membranas biológicas – os lipídeos e as proteínas. Apesar de nos focarmos principalmente na membrana plasmática, muitos dos conceitos aqui discutidos se aplicam também às membranas intracelulares. As funções das membranas celulares, incluindo seu papel no transporte de pequenas moléculas e na geração de energia, serão consideradas nos capítulos posteriores.

Núcleo
Peroxissomo
Retículo endoplasmático
Lisossomo
Vesícula
Aparelho de Golgi
Membrana plasmática
Mitocôndria

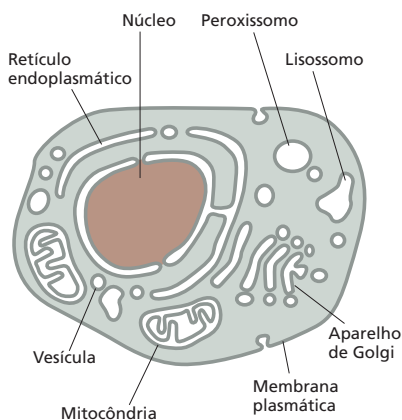



Figura 11-3 Membranas formam diversos compartimentos diferentes em uma célula eucariótica. As organelas delimitadas por membranas encontradas normalmente em uma célula animal são mostradas aqui. Note que o núcleo e a mitocôndria são delimitados por duas membranas.

A BICAMADA LIPÍDICA

A **bicamada lipídica** foi estabelecida como base universal da estrutura de membranas celulares, e suas propriedades são responsáveis pelas propriedades gerais de todas as membranas celulares. Como as células são preenchidas e estão imersas em soluções de moléculas solúveis em água, começaremos esta seção considerando como a estrutura da bicamada lipídica é decorrente do comportamento das moléculas de lipídeo em um ambiente aquoso.

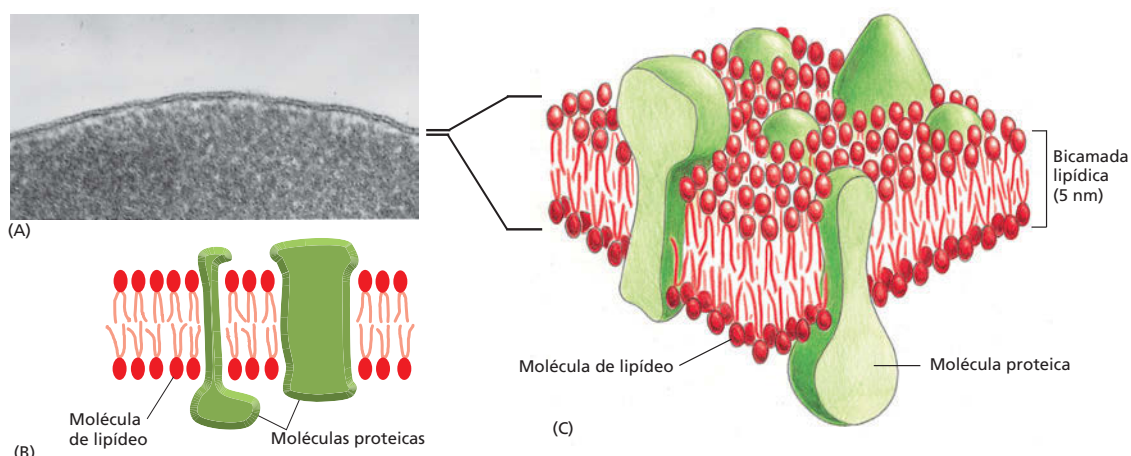



Figura 11-4 A membrana celular pode ser observada de diversas formas. (A) Eletromicrografia da membrana plasmática de uma hemácia, em secção transversal. (B e C) Desenhos esquemáticos mostrando visões bi e tridimensionais de uma membrana celular. (A, cortesia de Daniel S. Friend).

Membranas lipídicas formam bicamadas na água

Os lipídeos em uma membrana celular combinam duas propriedades diferentes em uma única molécula: cada lipídeo possui uma *cabeça* hidrofílica ("adora água") e uma ou duas *caudas hidrocarbonadas* hidrofóbicas ("têm medo de água") (**Figura 11-5**). Os lipídeos mais abundantes nas membranas celulares são os **fosfolipídeos**, moléculas cuja cabeça hidrofílica se liga ao restante do lipídeo por meio de um grupo fosfato. O fosfolipídeo mais comum na maioria das membranas celulares é a **fosfatidilcolina**, que possui uma pequena molécula de colina ligada ao grupo fosfato na sua cabeça hidrofílica e duas cadeias hidrocarbonadas longas como caudas hidrofóbicas (**Figura 11-6**).

Moléculas com propriedades tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas são denominadas **anfipáticas**. Essa propriedade química também é observada em outros lipídeos de membrana – os *esteróis* (como o colesterol encontrado na membrana celular de animais) e os *glicolipídeos,* que possuem açúcares como parte integrante da cabeça hidrofílica (**Figura 11-7**). A presença de partes hidrofóbicas e hidrofílicas tem papel crucial no arranjo das moléculas lipídicas como bicamadas em ambientes aquosos.

Como discutido no Capítulo 2, moléculas hidrofílicas se dissolvem rapidamente em água, pois contêm átomos carregados ou grupos polares, ou seja, grupos com distribuição desigual de cargas positivas e negativas; esses átomos carregados formam ligações eletrostáticas ou pontes de hidrogênio com moléculas de água, que são polares (**Figura 11-8**). Em contraste, moléculas hidrofóbicas são insolúveis em água, pois todos os – ou a maioria dos – seus átomos não possuem carga ou são apolares; dessa forma, eles não podem formar ligações com moléculas de água. Ao contrário, esses átomos apolares forçam o rearranjo das moléculas de água adjacentes em uma estrutura como um arcabouço ao redor da molécula hidrofóbica (**Figura 11-9**). Como, no arranjo em arcabouço ao redor das moléculas hidrofóbicas, as moléculas de água estão mais organizadas do que as moléculas do meio, o seu ordenamento requer energia. O custo energético é minimizado, entretanto se as moléculas hidrofóbicas se agruparem, limitando os contatos com a água para o menor número possível de moléculas. Assim, moléculas puramente hidrofóbicas, como lipídeos encontrados em adipócitos de animais e os óleos encontrados em sementes de plantas (**Figura 11-10A**), coalescem em uma única gota quando postos em água.

Em contraste, moléculas anfipáticas, como os fosfolipídeos (Figura 11-10B), sofrem duas forças opostas: a cabeça hidrofílica é atraída pela água, e as caudas hidrofóbicas evitam a água e se agrupam com outras moléculas hi-

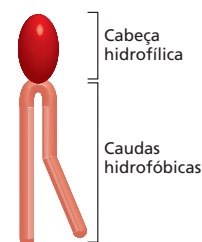



Figura 11-5 Uma típica molécula lipídica de membrana possui uma cabeça hidrofílica e caudas hidrofóbicas.

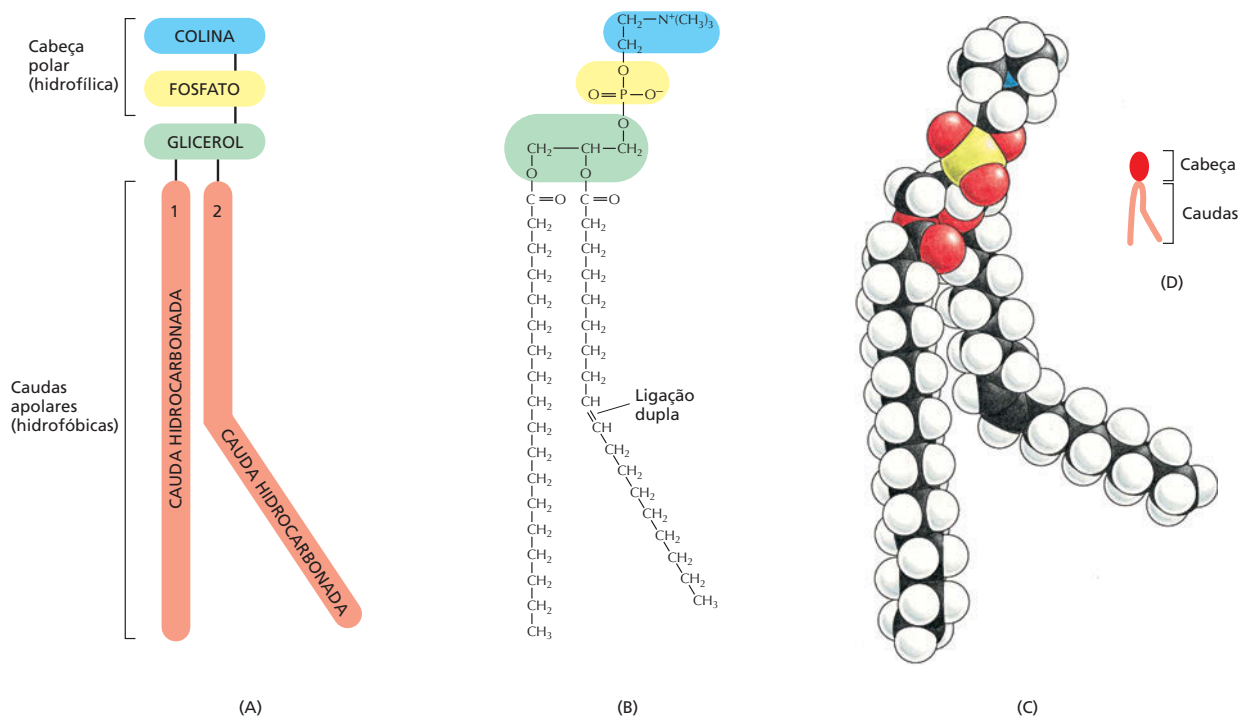



Figura 11-6 Fosfatidilcolina é o fosfolipídeo mais comum em membranas celulares. (A) Representação esquemática, (B) fórmula química, (C) modelo de preenchimento espacial e (D) representação simbólica. Esse fosfolipídeo é composto por cinco partes: a cabeça hidrofílica, *colina*, se liga, via *fosfato*, ao *glicerol*, que está ligado a duas *cadeias hidrocarbonadas* que formam a cauda hidrofóbica. As duas cadeias hidrocarbonadas derivam de *ácidos graxos* – as cadeias com grupos –COOH em uma das terminações –, que se ligam ao glicerol por meio de seus grupos –COOH. A dobra em uma das cadeias hidrocarbonadas ocorre onde há uma ligação dupla entre dois átomos de carbono, e está exagerada nos desenhos apenas para enfatizá-la. A porção "fosfatidil" do nome dos fosfolipídeos se refere à porção fosfato-glicerol-ácido graxo da molécula.

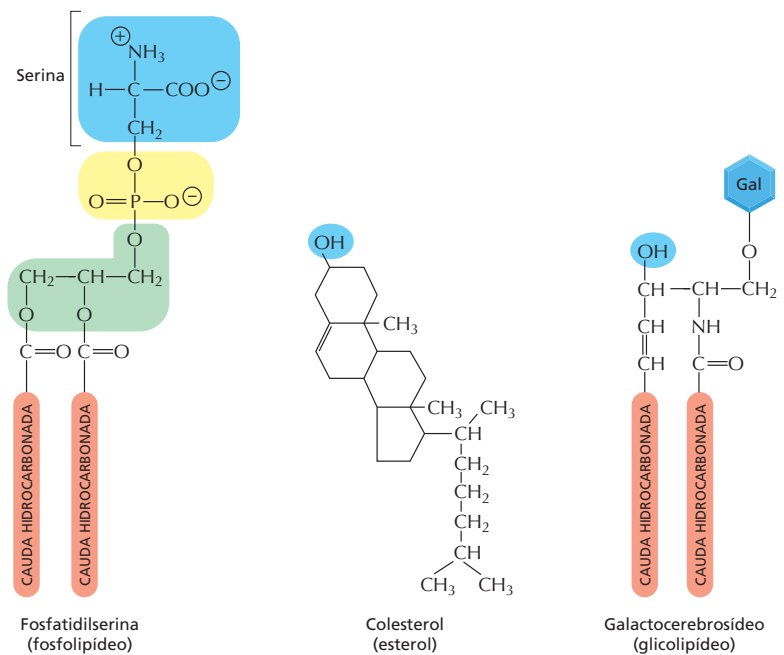



Figura 11-7 Diferentes tipos de lipídeos de membrana são anfipáticos. Cada um dos três tipos de lipídeos mostrado possui uma cabeça hidrofílica e uma ou duas caudas hidrofóbicas. A cabeça hidrofílica (destacada em *azul* e *amarelo)* é uma serina fosfato na fosfotidilserina, um grupo –OH no colesterol e um açúcar (galactose) e um grupo –OH no galactocerebrosídeo. Ver também Painel 2-4, p. 70-71.

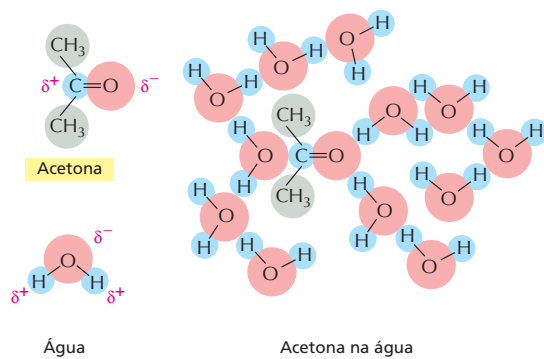



Figura 11-8 Uma molécula hidrofílica atrai moléculas de água. Como a cetona é polar, ela forma interações favoráveis com moléculas de água, que também são polares. Dessa forma, a acetona rapidamente se dissolve na água. δ^- indica uma carga parcial negativa, e δ^+ indica uma carga parcial positiva. Átomos polares são mostrados em *vermelho* e *azul;* grupos apolares são mostrados em *cinza*.

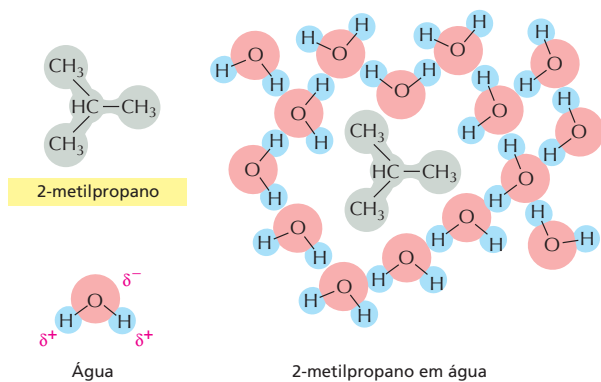



Figura 11-9 Uma molécula hidrofóbica tende a evitar contatos com a água. Como o 2-metilpropano é uma molécula completamente hidrofóbica, ele não forma interações favoráveis com a água e força moléculas adjacentes de água a se rearranjarem em uma estrutura de arcabouço ao seu redor.

drofóbicas. Esse conflito é resolvido com a formação da bicamada lipídica – um arranjo que satisfaz ambas as partes e é energeticamente favorável. As cabeças hidrofílicas permanecem expostas à água nas duas superfícies da bicamada, e as caudas hidrofóbicas ficam protegidas da água e justapostas no interior, como em um sanduíche (**Figura 11-11**).

As mesmas forças que atuam sobre moléculas anfipáticas para que formem bicamadas conferem também a propriedade de autosselamento. Qualquer ruptura na bicamada cria uma ponta livre exposta à água. Como isso é energeticamente desfavorável, as moléculas da bicamada se rearranjam espontaneamente para eliminar a ponta livre. Caso a ruptura seja pequena, esse rearranjo espontâneo irá excluir as moléculas de água e reparar a bicamada, restaurando a lâmina con-

QUESTÃO 11-1

Diz-se que as moléculas de água se arranjam como um arcabouço ao redor de compostos hidrofóbicos (p. ex., Figura 11-9). Isso parece paradoxal, já que moléculas de água não interagem com compostos hidrofóbicos. Como as moléculas de água reconhecem a diferença entre compostos hidrofílicos e hidrofóbicos e mudam seu comportamento para interagir de forma diferente com cada um deles? Discuta seu argumento e desenvolva um conceito claro do significado de "estrutura em arcabouço". Como ela pode ser comparada ao gelo? Por que essa estrutura é energeticamente desfavorável?

Triacilglicerol
(A)

Fosfatidiletanolamina
(B)

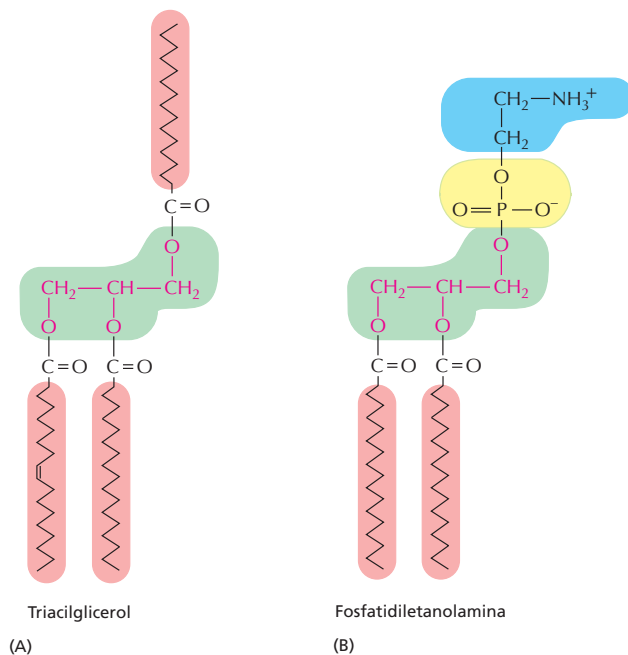



Figura 11-10 Moléculas lipídicas são hidrofóbicas, e fosfolipídeos são anfipáticos. (A) Triacilgliceróis, principais constituintes da gordura em animais e dos óleos em plantas, são moléculas totalmente hidrofóbicas. (B) Fosfolipídeos, como a fosfatidiletanolamina, são anfipáticos, contêm porções hidrofílicas e hidrofóbicas. As porções hidrofóbicas estão destacadas em *vermelho*, e as porções hidrofílicas em *azul* e *amarelo* (a terceira cauda hidrofóbica da molécula de triacilglicerol é mostrada orientada para cima para comparação com o fosfolipídeo, mas normalmente ela está orientada para baixo).

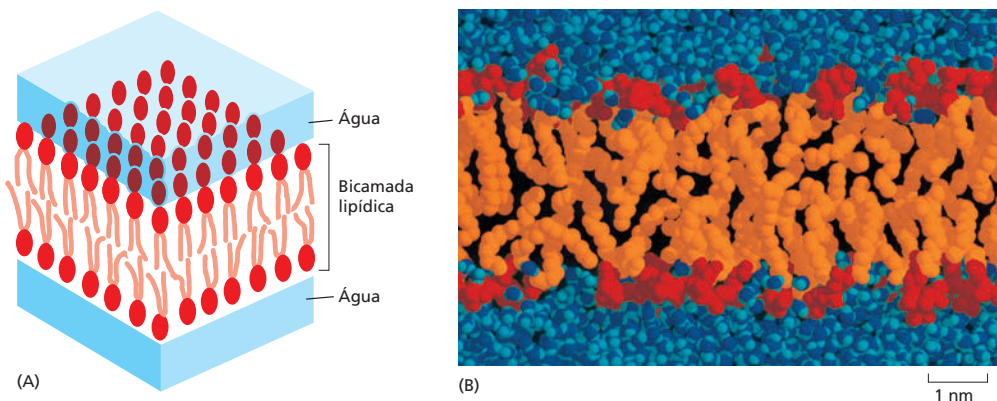



Figura 11-11 Fosfolipídeos anfipáticos formam bicamadas em água. (A) Desenho esquemático de uma bicamada lipídica em água. (B) Simulação computacional mostrando moléculas de fosfolipídeo (cabeças em *vermelho* e caudas em *laranja)* e de água *(azul)* ao redor, em secção transversal da bicamada. (B, adaptada de *Science* 262:223-228, 1993, com permissão de AAAS; cortesia de R. Venable e R. Pastor.)

tínua. Caso a ruptura seja grande, a lâmina pode enovelar-se sobre ela mesma e se quebrar em pequenas vesículas fechadas. Nos dois casos, as pontas livres são prontamente eliminadas.

A não ocorrência de pontas livres tem uma profunda consequência: a única maneira que uma lâmina finita tem de evitar pontas livres é formar uma esfera fechada (**Figura 11-12**). Consequentemente, moléculas anfipáticas como os fosfolipídeos necessariamente se arranjam em compartimentos fechados. Esse comportamento notável, fundamental para a criação de uma célula viva, é, em essência, simplesmente resultado da estrutura de cada molécula, hidrofílica em uma das terminações e hidrofóbica na outra.

A bicamada lipídica é um líquido bidimensional

O ambiente aquoso dentro e fora da célula previne que os lipídeos da membrana escapem da bicamada, mas nada impede que essas moléculas se movam e troquem de lugar umas com as outras no plano da bicamada. A membrana se comporta como um líquido bidimensional, o que é crucial para que exerça sua função e mantenha sua integridade (**Animação 11.1**). Essa propriedade é diferente de *flexibilidade,* que é a habilidade de se distender. A flexibilidade da membrana é também importante e impõe um limite de aproximadamente 25 nm como tamanho mínimo de vesículas que membranas podem formar.

A fluidez das bicamadas lipídicas pode ser estudada utilizando bicamadas lipídicas sintéticas, que são facilmente produzidas por agregação espontânea em água, de moléculas de lipídeos anfipáticos. Dois tipos de membranas sintéticas são comumente utilizados em experimentos. Vesículas esféricas fechadas, chamadas de *lipossomos,* formam-se quando fosfolipídeos puros são adicionados à água; seu tamanho varia de 25 nm a 1 mm de diâmetro (**Figura 11-13**). Alternativamente, lâminas de bicamadas lipídicas podem ser formadas sobre poros na partição entre dois compartimentos aquosos (**Figura 11-14**).

Essas membranas artificiais simples permitem a mensuração dos movimentos dessas moléculas lipídicas, revelando que alguns tipos de movimentos são raros, e outros são mais rápidos e frequentes. Assim, em bicamadas lipídicas sintéticas, as moléculas de fosfolipídeo raramente trocam de posição de uma monocamada (uma metade da bicamada) para a outra. Sem proteínas que facilitem o processo e sob condições similares às da célula, estima-se que esse evento, chamado de *flip-flop,* ocorra com uma frequência menor do que uma vez ao mês para uma molécula lipídica. Por outro lado, como resultado de agitação térmica, as moléculas de lipídeos de uma mesma monocamada trocam de lugar continuamente com seus vizinhos (**Figura 11-15**). Essas mudanças acarretam a rápida difusão de moléculas no plano da membrana, por exemplo, um lipídeo em uma membrana artificial pode deslocar-se o equivalente à largura de uma

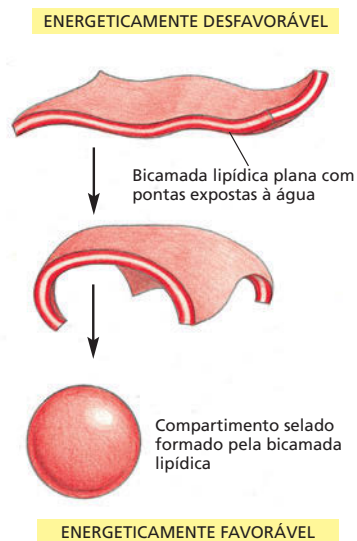



Figura 11-12 Bicamadas de fosfolipídeos se fecham expontaneamente sobre elas mesmas, formando compartimentos selados. A estrutura fechada é estável porque evita a exposição das caudas hidrocarbonadas à água, o que seria energeticamente desfavorável.

(A)

(B)

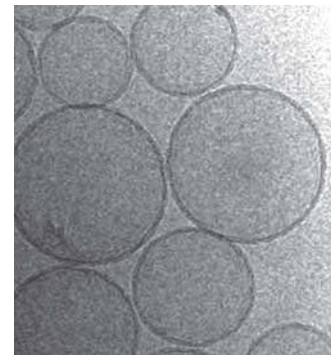
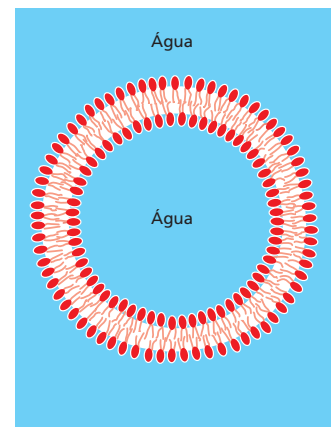
Figura 11-13 **Fosfolipídeos puros podem formar lipossomos fechados e esféricos.** (A) Micrografia de vesículas de fosfolipídeos (lipossomos) mostrando a estrutura em bicamada da membrana. (B) Desenho de um pequeno lipossomo esférico em secção transversal. (A, cortesia de Jean Lepault.)

bactéria (~2 μm) em um segundo. Se a temperatura diminui, a queda da energia térmica também diminui a taxa de movimentos dos lipídeos, tornando a bicamada menos fluida.

Constatações similares foram feitas observando membranas celulares isoladas e células inteiras, indicando que a bicamada lipídica de uma célula também se comporta como um líquido bidimensional, onde as moléculas lipídicas que a constituem são livres para mover-se na sua própria monocamada, na direção do plano da membrana. Esses estudos também demonstraram que as caudas hidrocarbonadas dos lipídeos são flexíveis e que moléculas lipídicas em uma monocamada fazem movimentos de rotação em torno do seu próprio eixo, algumas alcançando velocidades de 30.000 rpm (ver Figura 11-15). Nas células, assim como nas bicamadas sintéticas, as moléculas de fosfolipídeos estão confinadas na sua monocamada e não fazem *flip-flop* espontaneamente.

A fluidez da bicamada lipídica depende da sua composição

A fluidez da membrana celular – a facilidade com que as moléculas lipídicas se movem no plano da bicamada – é importante para as funções da membrana, devendo ser mantida dentro de certos limites. O quão fluida uma bicamada lipídica é em uma dada temperatura depende da sua composição de fosfolipídeos e, em particular, da natureza das caudas hidrocarbonadas: quanto mais próximas e mais regular for o empacotamento das caudas, mais viscosa e menos fluida será a bicamada. Duas propriedades principais das caudas hidrocarbonadas afetam o grau de empacotamento da bicamada: o seu comprimento e o número de ligações duplas que apresentam.

Cadeias mais curtas reduzem a tendência de formação de interações entre as caudas hidrocarbonadas, aumentando a fluidez da bicamada. As caudas hidrocarbonadas dos fosfolipídeos de membrana variam no comprimento entre 14 e 24 átomos de carbono, sendo 18-20 átomos o mais usual. A maioria dos fosfolipídeos contêm uma cauda hidrocarbonada com uma ou mais ligações duplas adjacentes a átomos de carbono, e a outra cauda com apenas ligações simples (ver Figura 11-6). As cadeias com ligações duplas não possuem o número máximo de átomos de hidrogênio que poderiam, em princípio, estar ligados ao esqueleto carbônico; por isso, são chamadas de **insaturadas** em relação ao hidrogênio. Uma cauda de ácido graxo sem ligações duplas possui todos os átomos de hidrogênio possíveis e é chamada de **saturada**. Cada ligação dupla em uma cauda insaturada cria uma pequena "dobra" (ver Figura 11-6) que torna mais difícil o empacotamento das caudas umas contra as outras. Por essa

QUESTÃO 11-2

Cinco estudantes em uma sala de aula sempre se sentam juntos na primeira fila de carteiras. Isso pode ocorrer porque (A) eles realmente se gostam, ou (B) nenhum outro aluno quer se sentar junto a eles. Qual das duas explicações também se aplica à formação da bicamada lipídica? Explique. Suponha que a outra explicação também se aplique às moléculas lipídicas, quão diferentes seriam as suas propriedades?

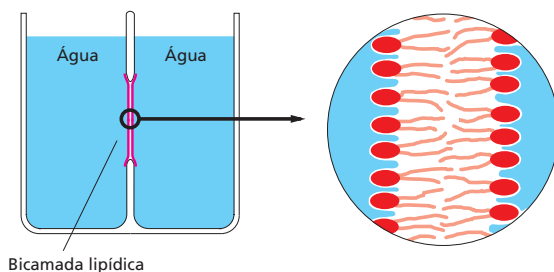



Figura 11-14 **Uma bicamada fosfolipídica sintética pode ser formada sobre um pequeno poro (de aproximadamente 1 mm de diâmetro) na partição de dois compartimentos aquosos.** Para formar uma bicamada plana, a partição é submersa em uma solução aquosa, e uma solução de fosfolipídeos (em um solvente não aquoso) é aplicada sobre o poro.

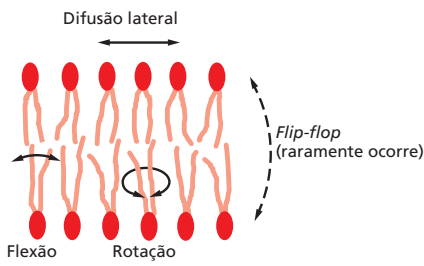



Figura 11-15 Fosfolipídeos podem mover-se no plano da membrana. O desenho mostra os tipos de movimentos possíveis às moléculas de fosfolipídeos em uma bicamada lipídica.

razão, uma bicamada lipídica que contenha uma grande proporção de caudas hidrocarbonadas insaturadas será mais fluida do que as que possuem menores proporções.

Em células de bactérias e leveduras, que se adaptam a diferentes temperaturas, tanto o comprimento quanto a insaturação das caudas hidrocarbonadas da bicamada são periodicamente ajustadas para manter a fluidez constante da membrana: em temperaturas mais altas, por exemplo, a célula produz lipídeos de membrana com caudas mais longas e com poucas ligações duplas. Uma estratégia similar é utilizada na produção de margarina a partir de óleos vegetais. Gorduras produzidas por plantas geralmente são insaturadas e, portanto, líquidas a temperatura ambiente, ao contrário das gorduras animais, como manteiga ou banha, que são saturadas e sólidas à temperatura ambiente. A margarina é feita a partir de óleos vegetais hidrogenados, cujas ligações duplas foram removidas pela adição de átomos de hidrogênio, tornando-a mais sólida à temperatura ambiente.

Em células animais, a fluidez da membrana é modulada pela inclusão de moléculas do esterol **colesterol** (**Figura 11-16A**). Essas moléculas estão presentes em grandes quantidades na membrana plasmática, representando aproximadamente 20% dos lipídeos do total do peso da membrana. Como as moléculas de colesterol são pequenas e rígidas, elas preenchem os espaços vazios entre moléculas vizinhas de fosfolipídeos, originados pelas dobras das suas caudas hidrocarbonadas insaturadas (Figura 11-16B). Dessa forma, o colesterol tende a reforçar a bicamada, tornando-a mais rígida e menos permeável. As propriedades químicas dos lipídeos de membrana – e como elas afetam a fluidez da membrana – são revisadas na **Animação 11.2**.

Para todas as células, a fluidez da membrana é importante por muitas razões. Ela permite a rápida difusão das proteínas de membrana no plano da bicamada e a sua interação com outras proteínas, fator crucial, por exemplo, na sinalização celular (discutida no Capítulo 16). Ela também permite a difusão de lipídeos e proteínas dos locais da membrana nos quais são inseridos logo após sua síntese para outras regiões da célula. A fluidez também possibilita a fusão de membranas diferentes e a mistura de suas moléculas e assegura que moléculas da membrana sejam distribuídas igualmente entre as células-filhas na divisão celular. Caso as membranas biológicas não fossem fluidas, ficaria difícil imaginar como as células poderiam viver, crescer e se reproduzir.

A bicamada lipídica é assimétrica

Membranas celulares geralmente são assimétricas: a face voltada para o interior da célula ou organela é diferente da face voltada para o exterior. As duas metades

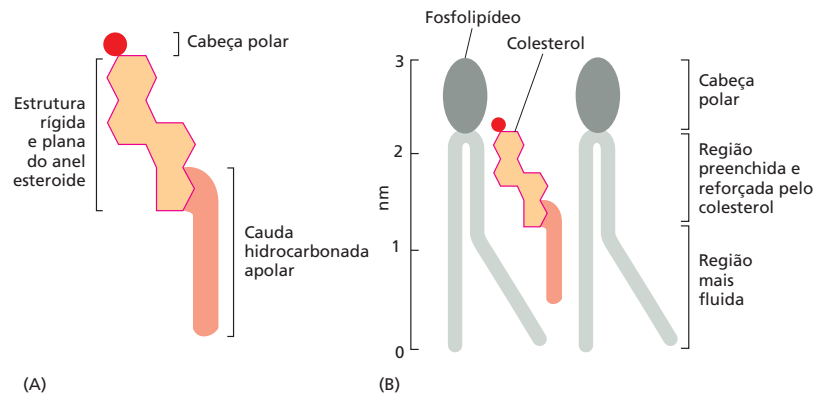



Figura 11-16 O colesterol reforça membranas celulares. (A) A estrutura do colesterol. (B) Como o colesterol se posiciona nos espaços entre as moléculas de fosfolipídeos na bicamada lipídica. A fórmula química do colesterol é mostrada na Figura 11-7.

Figura 11-17 Fosfolipídeos e glicolipídeos têm distribuição assimétrica na bicamada lipídica da membrana plasmática. Cinco tipos de moléculas de fosfolipídeos são mostradas em cores diferentes: fosfatidilcolina *(vermelho)*, esfingomielina *(marrom)*, fosfatidilserina *(verde-claro)*, fosfatidilinositol *(verde-escuro)* e fosfatidiletanolamina *(amarelo)*. Glicolipídeos estão representados como grupos polares hexagonais *azuis*, como açúcares. Todas as moléculas de glicolipídeos estão na monocamada externa da membrana, e moléculas de colesterol *(cinza)* têm distribuição quase igualitária nas duas monocamadas. O fosfatidilinositol é um lipídeo presente em menor quantidade, sempre encontrado na face citosólica da membrana plasmática, onde atua na sinalização celular. Uma vez que apresenta um açúcar inositol ligado à cabeça da estrutura do fosfolipídeo, ele é uma exceção quanto à localização de glicolipídeos.

da bicamada frequentemente possuem composições diferentes de moléculas de fosfolipídeos e glicolipídeos (**Figura 11-17**). Além disso, as proteínas são embebidas na bicamada com orientações específicas, o que é crucial para sua função.

A assimetria de lipídeos é estabelecida e mantida conforme a membrana cresce. Em células eucarióticas, novas moléculas de fosfolipídeos são sintetizadas por enzimas localizadas na face voltada para o citosol da membrana do retículo endoplasmático (RE). Essas enzimas usam como substrato ácidos graxos livres (ver Painel 2-4, p. 70-71) e depositam os fosfolipídeos recém-sintetizados na metade citosólica da bicamada lipídica. Para que a membrana cresça por igual, como um todo, uma proporção dos lipídeos recém-sintetizados precisa ser transferida para a monocamada oposta. Essa transferência é catalisada por enzimas denominadas *flipases* (**Figura 11-18**). Algumas flipases transferem seletivamente moléculas específicas de fosfolipídeos, fazendo com que cada monocamada tenha uma concentração diferente de fosfolipídeos.

A ação de flipases seletivas não é a única maneira de produzir assimetria em bicamadas lipídicas. Em particular, há um mecanismo diferente para os glicolipídeos – a classe de moléculas lipídicas cuja distribuição é mais assimétrica nas células animais (ver Figura 11-17). Para explicar sua distribuição, é necessário um olhar mais cuidadoso na rota de produção de novas membranas em células eucarióticas.

A assimetria dos lipídeos é preservada durante o transporte de membranas

Nas células eucarióticas, toda síntese de novas membranas ocorre em um compartimento intracelular – o *retículo endoplasmático* (RE; ver Figura 11-3). A nova membrana formada é exportada até outras membranas da célula por meio de ciclos de formação e fusão de vesículas: porções de membrana se destacam do RE formando pequenas esferas denominadas *vesículas*, que se incorporam a outras membranas, como a membrana plasmática, por fusão (**Figura 11-19**). A orientação da bicamada em relação ao citosol é preservada durante o transporte das vesículas. Essa preservação da orientação significa que todas as membranas celulares, seja a membrana plasmática externa, seja a membrana intracelular de organelas, possuem faces "internas" e "externas" distintas, estabelecidas no momento da síntese da membrana: a face *citosólica* é sempre adjacente ao citosol, e a face *não citosólica* é exposta ao exterior da célula ou ao espaço interno de organelas (ver Figura 11-19).

Glicolipídeos se localizam principalmente na membrana plasmática e são observados apenas na metade não citosólica da bicamada. Seus grupos açúcar ficam expostos ao exterior da célula (ver Figura 11-17), onde formam uma camada de carboidratos contínua que envolve e protege a maioria das células animais. As moléculas glicolipídicas adquirem seus grupos açúcar no aparelho de Golgi, a organela para onde vão as proteínas e membranas sintetizadas no RE (discutido no Capítulo 15). As enzimas que adicionam os grupos açúcar estão confinadas

Figura 11-18 O papel das flipases na síntese da bicamada lipídica. Moléculas de fosfolipídeos recém-sintetizadas são adicionadas à face citosólica da membrana do RE. Flipases transferem algumas dessas moléculas para a monocamada oposta, permitindo que toda a bicamada se expanda.

Figura 11-19 **As membranas mantêm a sua orientação mesmo após a sua transferência entre compartimentos celulares.** As membranas são transportadas através de processos de protrusão e fusão. Aqui, uma vesícula é mostrada se destacando de uma organela delimitada por membrana (como o retículo endoplasmático ou o complexo de Golgi) e se fusionando à membrana plasmática. Note que a orientação da membrana é preservada durante este processo: a fase citosólica original (*vermelha*) permanece voltada para o citosol, e a face não citosólica (*laranja*) permanece voltada para o lúmen da organela, ou vesícula, ou para o líquido extracelular.

no interior do complexo de Golgi; dessa forma, apenas as moléculas lipídicas da metade não citosólica da bicamada sofrem a adição de açúcar. Uma vez que as moléculas de glicolipídeos tenham sido criadas dessa forma, elas permanecem nessa monocamada, pois não há flipases que as transfiram para a metade citosólica. Assim, quando a molécula é finalmente entregue à membrana plasmática, o glicolipídeo permanece na metade não citosólica e expõe seu açúcar ao exterior da célula (ver Figura 11-19).

Outras moléculas lipídicas mostram padrões diferentes de distribuição assimétrica relacionados às suas funções. O *fosfolipídeo inositol,* por exemplo, é um componente menor da membrana plasmática, mas possui um papel especial no transporte de sinais da superfície celular para componentes intracelulares que respondem a esses sinais (discutido no Capítulo 16). Ele atua após o sinal ser transmitido através da membrana plasmática, estando concentrado na metade citosólica da bicamada lipídica (ver Figura 11-17).

PROTEÍNAS DE MEMBRANA

Apesar de a bicamada lipídica prover a estrutura básica de todas as membranas celulares e servir como uma barreira semipermeável a moléculas nas suas duas faces, a maior parte das funções da membrana são desempenhadas pelas **proteínas de membrana**. Nos animais, as proteínas constituem cerca de 50% da massa da maioria das membranas plasmáticas, sendo o restante constituído por lipídeos e pequenas quantidades de carboidratos encontrados em glicolipídeos e proteínas glicosiladas. Como as moléculas de lipídeo são muito menores do que as proteínas, uma membrana celular contém tipicamente 50 vezes mais lipídeos do que proteínas (ver Figura 11-4).

As proteínas de membrana não apenas transportam nutrientes, metabólitos e íons através da bicamada lipídica, elas também possuem muitas outras funções. Algumas ancoram macromoléculas à membrana. Outras atuam como receptores para sinais químicos no ambiente em que a célula se encontra e os transportam (os sinais) para o interior da célula, e há, ainda, as enzimas que catalisam reações específicas (**Figura 11-20** e **Tabela 11-1**). Cada tipo de membrana celular contém um conjunto diferente de proteínas, refletindo as funções especializadas de cada tipo de membrana em particular. Nesta seção, discutiremos a estrutura das proteínas de membrana e ilustraremos as diferentes maneiras com que podem estar associadas à bicamada lipídica.

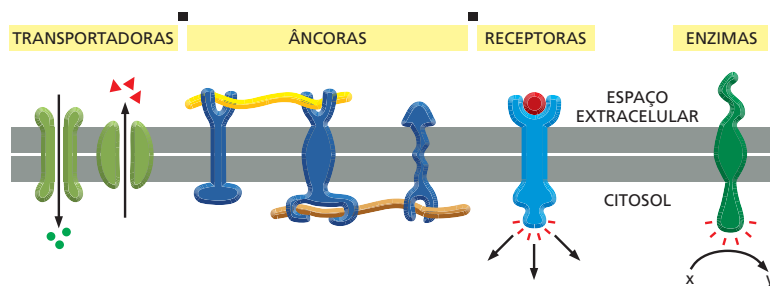



Figura 11-20 As proteínas da membrana plasmática possuem uma variedade de funções.

TABELA 11-1 Alguns exemplos de proteínas de membrana e suas funções

Classe funcional	Exemplo	Função específica
Transportadoras	Bomba de Na^+	Bombeia de forma ativa Na^+ para fora da célula e K^+ para dentro (conforme descrito no Capítulo 12)
Âncoras	Integrinas	Ligam filamentos intracelulares de actina a proteínas extracelulares da matriz (discutido no Capítulo 20)
Receptoras	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, de *platelet-derived growth factor*)	Liga PDGF extracelular e gera sinais intracelulares que acarretam o crescimento e a divisão celular (discutido no Capítulo 18)
Enzimas	Adenilato-ciclase	Catalisa a produção intracelular de cAMP em resposta a sinais extracelulares (descrito com mais detalhes no Capítulo 16)

Proteínas de membrana se associam à bicamada lipídica de diversas formas

Proteínas podem estar associadas à bicamada lipídica de uma membrana celular de diversas maneiras (**Figura 11-21**):

1. Muitas proteínas de membrana se estendem através da bicamada lipídica, com parte da sua massa nos dois lados da bicamada (Figura 11-21A). Como os seus lipídeos adjacentes, essas *proteínas transmembrana* possuem regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. Suas regiões hidrofóbicas ficam no interior da bicamada, dispostas contra as caudas hidrofóbicas das moléculas lipídicas. Suas regiões hidrofílicas ficam expostas ao ambiente aquoso nos dois lados da membrana.
2. Outras proteínas de membrana estão localizadas inteiramente no citosol, associadas à metade interna da bicamada lipídica por meio de uma α-hélice anfipática exposta na superfície da proteína (Figura 11-21B).
3. Algumas proteínas estão inteiramente externas à bicamada lipídica, de um lado ou de outro, conectadas à membrana apenas por um ou mais grupos lipídicos covalentemente ligados (Figura 11-21C).
4. Há ainda proteínas ligadas indiretamente a uma das faces da membrana, mantidas no lugar apenas por meio de interações com outras proteínas de membrana (Figura 11-21D).

Proteínas que são diretamente ligadas à membrana – sejam elas transmembrana, associadas a uma monocamada ou ligadas por meio de lipídeos – podem ser removidas apenas com a ruptura da bicamada lipídica com detergentes, conforme discutido. Essas proteínas são conhecidas como *proteínas integrais*

Figura 11-21 Proteínas de membrana podem se associar à bicamada lipídica de diversas maneiras. (A) Proteínas transmembrana se estendem através da bicamada como uma única α-hélice, ou múltiplas α-hélices, ou como folhas β dobradas (chamadas de barril β). (B) Algumas proteínas de membrana são ancoradas à superfície citosólica por meio de uma α-hélice anfipática. (C) Outras se ligam a um dos lados da bicamada apenas por meio de uma ligação covalente com uma molécula lipídica (linhas *vermelhas* em zigue-zague). (D) Por fim, muitas proteínas estão ligadas à membrana apenas por interações não covalentes e relativamente fracas com outras proteínas de membrana.

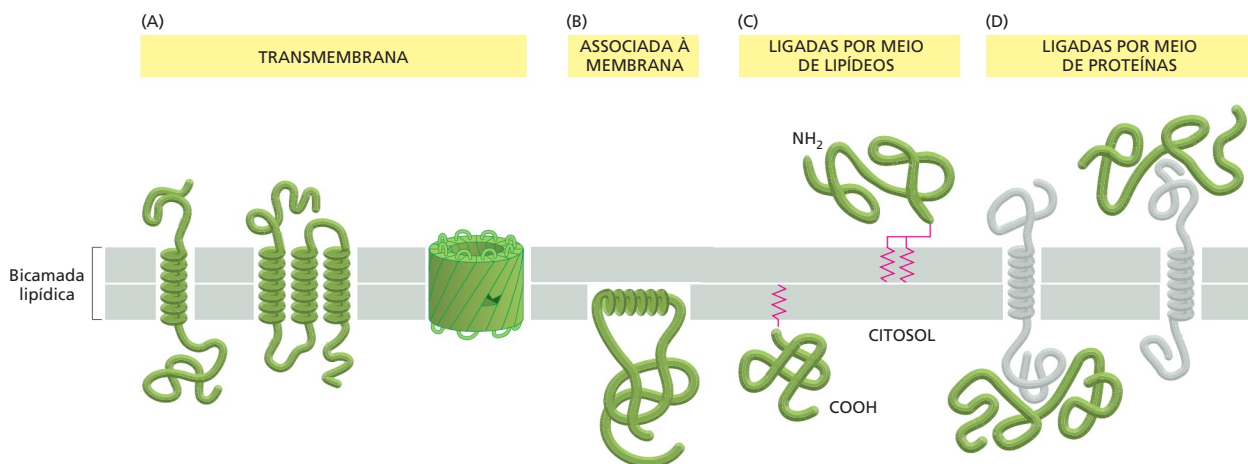
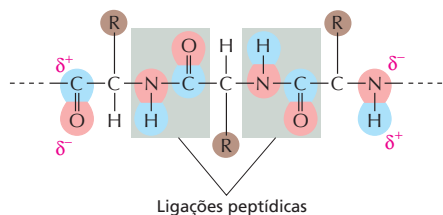



Figura 11-22 A ligação peptídica (destacada em *cinza*) que une dois aminoácidos adjacentes em uma cadeia polipeptídica polar e, portanto, hidrofílica. As cargas parciais (δ^- indica uma carga parcial negativa, e δ^+ indica uma carga parcial positiva) permitem que esses átomos formem pontes de hidrogênio uns com os outros quando o polipeptídeo se enovela em uma α-hélice que atravessa a membrana (ver Figura 11-23).

de membrana. As demais proteínas de membrana são conhecidas como *proteínas periféricas de membrana;* elas podem ser liberadas da membrana por procedimentos de extração mais amenos, que afetam interações proteína-proteína, mas mantêm a bicamada lipídica intacta.

Uma cadeia polipeptídica geralmente atravessa a bicamada lipídica como uma α-hélice

Todas as proteínas de membrana possuem uma única orientação na bicamada lipídica, que é essencial para a sua função. Em uma proteína receptora transmembrana, por exemplo, a porção da proteína que recebe o sinal do ambiente precisa estar sempre exposta ao exterior da célula, e a porção que transmite o sinal deve estar voltada para o citosol (ver Figura 11-20). Essa orientação é uma consequência do modo como as proteínas de membrana são sintetizadas (como discutido no Capítulo 15). As porções da proteína transmembrana que permanecem na face externa da bicamada lipídica são conectadas a segmentos especializados da cadeia polipeptídica que transpassam a membrana (ver Figura 11-21A). Esses segmentos, que atravessam o ambiente hidrofóbico do interior da bicamada lipídica, são compostos principalmente por aminoácidos de cadeias laterais hidrofóbicas. Como esses aminoácidos não podem formar interações favoráveis com a água, eles preferem o ambiente lipídico, no qual não há moléculas de água.

Ao contrário das cadeias laterais hidrofóbicas, as ligações peptídicas que unem aminoácidos sucessivos em uma proteína são normalmente polares, tornando a cadeia principal do polipeptídeo hidrofílica (**Figura 11-22**). Como não há moléculas de água no interior da bicamada lipídica, os átomos que constituem a cadeia principal formam pontes de hidrogênio uns com os outros. As pontes de hidrogênio são maximizadas se a cadeia polipeptídica formar uma α-hélice regular, e, dessa forma, a maior parte dos segmentos de cadeias polipeptídicas que atravessa membranas o faz como α-hélices (ver Figura 4-10). Nessas α-hélices transmembrana, as cadeias laterais hidrofóbicas estão expostas no exterior da hélice, onde fazem contato com as caudas hidrofóbicas dos lipídeos, e os átomos da cadeia principal formam pontes de hidrogênio uns com os outros no interior da hélice (**Figura 11-23**).

Figura 11-23 Um segmento de α-hélice atravessa a bicamada lipídica. As cadeias laterais hidrofóbicas dos aminoácidos que formam a α-hélice fazem contato com as caudas hidrocarbonadas das moléculas de fosfolipídeo, e as partes hidrofílicas da cadeia principal formam pontes de hidrogênio no interior da hélice. Cerca de 20 aminoácidos são necessários para uma α-hélice atravessar completamente uma membrana em orientação transversal.

Em muitas proteínas transmembrana, a cadeia polipeptídica atravessa a membrana apenas uma vez (Figura 11-21A). Outras proteínas transmembrana formam canais de água que permitem a passagem de moléculas solúveis em água através da membrana. Esses canais não podem ser formados por proteínas com uma única α-hélice hidrofóbica transmembrana. Essas proteínas transmembrana mais complexas geralmente possuem uma série de α-hélices que atravessam a bicamada lipídica várias vezes (ver Figura 11-21A). Em muitas dessas proteínas, uma ou mais porções transmembrana são formadas por α-hélices que contêm tanto cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicas quanto hidrofílicas. Esses aminoácidos estão dispostos de modo que as cadeias laterais hidrofóbicas são dispostas de um lado da hélice, e as cadeias laterais hidrofílicas se concentram no outro lado da hélice. No ambiente hidrofóbico da bicamada lipídica, essas α-hélices tendem a agrupar-se formando um anel, com as cadeias laterais hidrofóbicas expostas aos lipídeos da membrana, e as cadeias laterais hidrofílicas formando parte da superfície interna do canal hidrofílico que transpassa a bicamada lipídica (**Figura 11-24**). Como esses canais funcionam no transporte seletivo de pequenas moléculas solúveis em água é discutido no Capítulo 12.

Apesar de as α-hélices serem a forma mais comum com que cadeias polipeptídicas atravessam bicamadas lipídicas, as cadeias polipeptídicas de algumas proteínas transmembrana o fazem como folhas β, dobradas como um cilindro, formando uma estrutura sem fundo, chamada de *barril* β. Como seria de se esperar, as cadeias laterais de aminoácidos voltadas para o interior do barril e que, dessa forma, delimitam o canal de água são principalmente hidrofílicas. As cadeias laterais voltadas para o exterior do barril e que fazem contato com o núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica são exclusivamente hidrofóbicas. O exemplo mais marcante da estrutura do barril β é encontrado na proteína *porina,* que forma grandes canais de água nas membranas de mitocôndrias e bactérias (**Figura 11-25**). Mitocôndrias e algumas bactérias são circundadas por uma membrana dupla, e as porinas permitem a passagem de nutrientes e pequenos íons através de suas membranas externas, além de prevenir a entrada de grandes moléculas como antibióticos e toxinas. Ao contrário das α-hélices, barris β podem formar apenas canais grandes, pois a curvatura das folhas β é limitada. Sob esse aspecto, um barril β é menos versátil do que um conjunto de α-hélices.

Figura 11-24 Um poro hidrofílico transmembrana pode ser formado por múltiplas α-hélices. Nesse exemplo, cinco α-hélices transmembrana formam um canal de água que atravessa a bicamada lipídica. As cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicas *(verde)* de cada hélice fazem contato com as caudas hidrocarbonadas hidrofóbicas, e as cadeias laterais hidrofílicas *(vermelho)* no lado oposto formam o canal.

Proteínas de membrana podem ser solubilizadas com detergentes e então purificadas

Para entender completamente uma proteína, é preciso conhecer sua estrutura em detalhes, e para proteínas de membrana isso é um problema em especial. A maioria dos procedimentos bioquímicos é desenvolvida para estudar moléculas dissolvidas em água ou outro solvente simples; proteínas de membrana, porém, são arranjadas de forma a operar em ambientes parcialmente aquosos e lipídicos; extraí-las desse ambiente e purificá-las preservando sua estrutura não é um desafio simples.

Antes de uma proteína poder ser estudada em detalhes, ela deve ser separada de todas as demais proteínas celulares. Para muitas proteínas de membrana, a primeira etapa do processo de separação envolve a solubilização da membrana por agentes que desfazem a bicamada lipídica rompendo suas associações hidrofóbicas. Os agentes mais utilizados nesse processo são os **detergentes** (**Animação 11.3**). Detergentes são pequenas moléculas anfipáticas similares a lipídeos e que possuem uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica (**Figura 11-26**). Detergentes diferem dos fosfolipídeos da membrana, pois possuem apenas uma única cauda hidrofóbica, e consequentemente se comportam de maneira distinta. Por possuírem uma única cauda hidrofóbica, moléculas de detergente têm o formato de cones; na água, elas tendem a agregar-se em pequenos grupos denominados *micelas,* não formando bicamadas como os fosfolipídeos, que possuem um formato cilíndrico.

Quando uma grande quantidade de detergente é misturada a membranas, as caudas hidrofóbicas das moléculas de detergente se ligam às regiões hidrofóbicas dos segmentos transmembrana de proteínas, bem como às caudas hidrofóbicas das moléculas de fosfolipídeo, rompendo a estrutura da bicamada e separando, assim, as proteínas dos fosfolipídeos. Como a outra extremidade da molécula de detergente é hidrofílica, essa associação torna as proteínas de membrana solúveis como complexos proteína-detergentes (**Figura 11-27**). Ao mesmo tempo, o detergente solubiliza os fosfolipídeos. Os complexos proteína-detergentes podem ser separados uns dos outros e de complexos lipídeo-detergentes por técnicas como a da eletroforese SDS em gel de poliacrilamida (discutido no Capítulo 4).

QUESTÃO 11-4

Explique por que a cadeia polipeptídica da maioria das proteínas transmembrana atravessa a bicamada lipídica como α-hélices ou barris β.

Figura 11-25 Proteínas porina formam canais de água na membrana externa de bactérias *(Rhodobacter capsulatus).* A proteína consiste em 16 folhas β dobradas sobre si mesmas, formando um canal de água, como mostrado nesta figura tridimensional determinada por cristalografia por difração de raios X. Apesar de não mostrado na figura, três porinas se associam formando um trímero, que contém três canais separados. (De S.W. Cowan, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:501-507, 1993. Com permissão da Elsevier.)

Sódio dodecil sulfato (SDS)

Triton X-100

Figura 11-26 SDS e Triton X-100 são dois detergentes comumente utilizados. Sódio dodecil sulfato (SDS) é um forte detergente iônico (ou seja, possui um grupo ionizável em sua extremidade hidrofílica), e Triton X-100 é um detergente não iônico suave (possui uma estrutura não ionizável, porém polar na sua extremidade hidrofílica). A porção hidrofóbica de cada detergente é mostrada em *azul*, e a porção hidrofílica em *vermelho*. A porção entre colchetes na estrutura do Triton X-100 é repetida cerca de oito vezes. Detergentes iônicos fortes, como o SDS, não apenas separam proteínas das membranas, como também desmancham sua estrutura terciária (ver Painel 4-5, p. 166).

QUESTÃO 11-5

Para os dois detergentes mostrados na Figura 11-26, explique por que as porções das moléculas em vermelho são hidrofílicas, e as azuis, hidrofóbicas. Desenhe um segmento de cadeia polipeptídica, composto por três aminoácidos hidrofóbicos (ver Painel 2-5, p. 72-73) e aplique um esquema de cores similar.

Poucas proteínas de membrana têm estrutura completa conhecida

Por muitos anos, muito do que sabíamos sobre a estrutura de proteínas fora aprendido por meios indiretos. O método-padrão de determinação de estruturas de proteínas é a cristalografia por difração de raios X (ver Figura 4-48), que requer cristais ordenados de molécula. As proteínas de membrana já provaram ser mais difíceis de cristalizar do que as proteínas solúveis encontradas no citosol ou em líquido extracelular. No entanto, com os recentes avanços na cristalografia, a estrutura cristalográfica de diversas proteínas de membrana foi determinada em alta resolução, incluindo a *bacteriorrodopsina* e o *centro de reação fotossintética* – proteínas de membrana com importantes papéis na captura e no uso da energia solar, uma habilidade revisada no Capítulo 14. A estrutura da bacteriorrodopsina revelou como exatamente as α-hélices atravessam a bicamada lipídica, e a estrutura do centro de reação fotossintética revelou em detalhes como um conjunto de diferentes moléculas proteicas se associa formando complexos funcionais na membrana.

A **bacteriorrodopsina** é uma pequena proteína (de cerca de 250 aminoácidos) encontrada em grandes quantidades na membrana plasmática da arqueobactéria *Halobacterium halobium,* que habita pântanos salgados. A bacteriorrodopsina funciona como uma proteína de membrana de transporte que bombeia H^+ (prótons) para fora da bactéria. O bombeamento requer energia, e a bacteriorrodopsina obtém sua energia diretamente da luz solar. Cada molécula de bacteriorrodopsina contém uma molécula não proteica capaz de absorver luz – chamada de *retinal* – que confere à proteína (e à bactéria) a cor roxa intensa. Essa pequena molécula hidrofóbica é covalentemente ligada a uma das sete α-hélices transmembrana da bacteriorrodopsina e permanece no plano da bicamada lipídica completamente cercada pelas sete α-hélices (**Figura 11-28**). Quando o retinal absorve um fóton de luz, ele muda sua forma e, ao fazê-lo, causa uma série de

Figura 11-27 Proteínas de membrana podem ser solubilizadas por detergentes suaves como o Triton X-100. As moléculas de detergente (*dourado*) são mostradas como monômeros e micelas, a forma com que essas moléculas tendem a agrupar-se quando em água. A cabeça hidrofílica do detergente é representada pela extremidade com o círculo. Detergentes rompem a bicamada lipídica e tornam as proteínas solúveis na forma de complexos proteína-detergentes. Os fosfolipídeos da membrana também são solubilizados por detergentes.

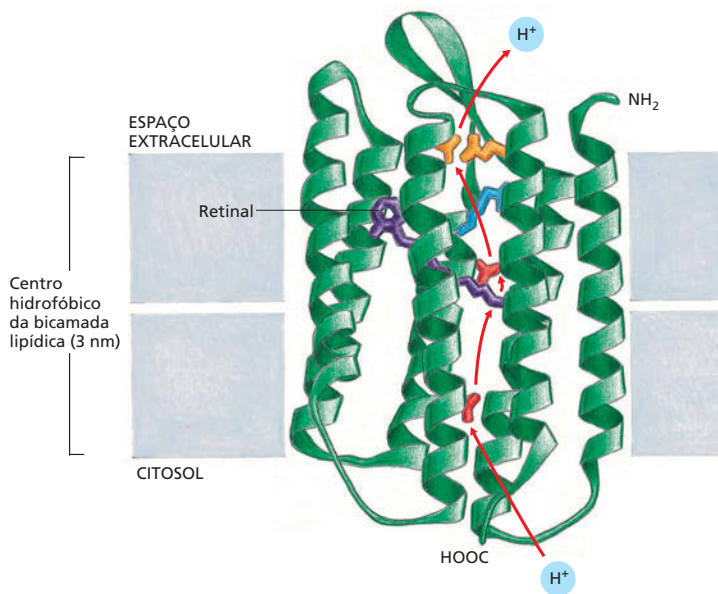



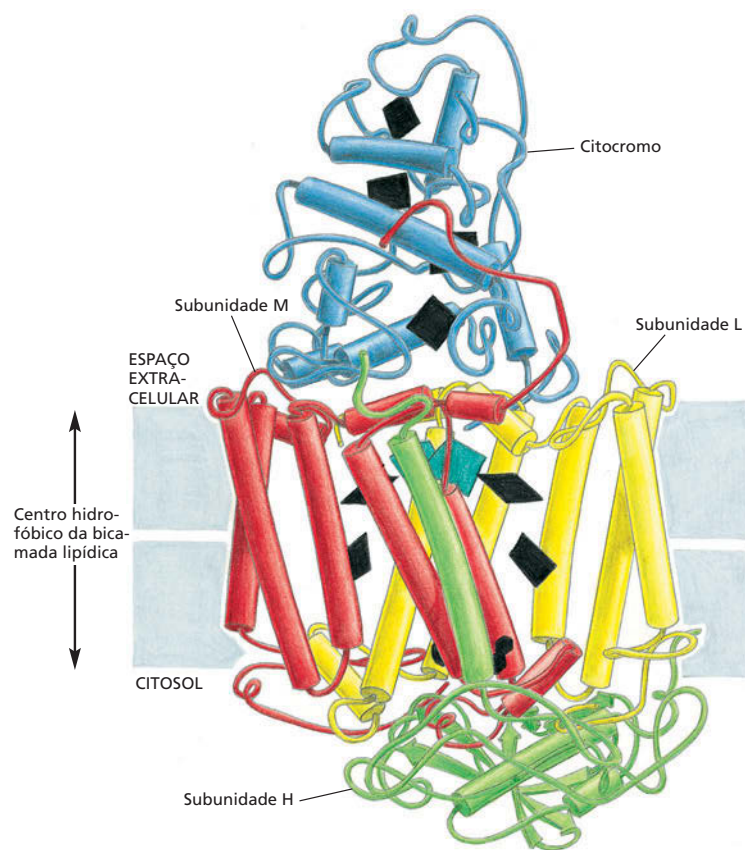
Figura 11-28 A bacteriorrodopsina funciona como uma bomba de prótons. A cadeia polipeptídica atravessa a bicamada lipídica como sete α-hélices. A localização do retinal (*lilás*) e o provável caminho percorrido pelos prótons durante o ciclo de bombeamento ativado pela luz é mostrado. Duas cadeias laterais de aminoácidos polares envolvidos no processo de transferência de H^+ são mostrados em *vermelho*, *amarelo* e *azul*. Note que o caminho percorrido pelos prótons (setas *vermelhas*) é tal que o contato com a bicamada lipídica é evitado. As etapas da transferência de elétrons são mostradas na **Animação 11.4**. Retinal é também utilizado para detectar luz nos nossos olhos, onde ele está ligado a uma proteína de estrutura similar à da bacteriorrodopsina. (Adaptada de H. Luecke *et al.*, *Science* 286: 255-260, 1999. Com permissão de AAAS.)

pequenas modificações conformacionais nas proteínas embebidas na bicamada lipídica. Essas mudanças resultam na transferência de um H^+ do retinal para o exterior da bactéria: o H^+ se move através da bicamada ao longo de um caminho de cadeias laterais de aminoácidos polares estrategicamente dispostos (ver Figura 11-28). O retinal é então regenerado recebendo um H^+ do citosol, trazendo a proteína de volta à sua conformação original de modo que o ciclo possa ser repetido. O resultado líquido é a transferência de um H^+ para fora da bactéria, o que diminui a concentração de H^+ no interior da célula. Na presença de luz solar, milhares de moléculas de bacteriorrodopsina bombeiam H^+ para fora da célula, gerando um gradiente de concentração de H^+ através da membrana bacteriana. Esse gradiente de prótons serve como um estoque de energia, como água represada. As células utilizam esse gradiente de prótons para armazenar energia e então convertê-la em ATP, como será discutido em detalhes no Capítulo 14. A bacteriorrodopsina é um tipo de *proteína transportadora*, uma classe de proteínas transmembrana que deslocam moléculas e íons para o interior e exterior da célula (ver Figura 11-20). Discutiremos outros transportadores no Capítulo 12.

A estrutura do centro de reação fotossintética bacteriano é mostrada na **Figura 11-29**. Ele é um grande complexo formado por quatro moléculas proteicas. Três delas são proteínas transmembrana; duas dessas (M e L) possuem múltiplas α-hélices cruzando a bicamada lipídica, e a outra (H) possui apenas uma. A quarta proteína (citocromo) está associada apenas à superfície externa da membrana, ligada às proteínas transmembrana. Esse complexo proteico funciona como uma máquina molecular, transformando a energia solar absorvida pela clorofila em elétrons de alta energia necessários para as reações fotossintéticas (discutido no Capítulo 14). Muitas proteínas de membrana estão arranjadas em grandes complexos, e a estrutura do centro de reação fotossintética é um bom modelo para milhares de outras proteínas de membrana cuja estrutura ainda não é conhecida.

A membrana plasmática é reforçada pelo córtex celular

A membrana celular, por si só, é extremamente fina e frágil. Seriam necessárias aproximadamente 10.000 membranas celulares dispostas umas sobre as outras para atingir a espessura desta folha de papel. Muitas membranas celulares são reforçadas e sustentadas por um arcabouço de proteínas ligadas à membrana por meio das proteínas transmembrana. Em particular, a forma da célula e as

Figura 11-29 O centro de reação fotossintética da bactéria *Rhodopseudomonas viridis* absorve energia da luz solar. Sua estrutura tridimensional foi determinada por cristalografia por difração de raios X. O complexo consiste em quatro subunidades – L, M, H e um citocromo. As subunidades L e M formam o núcleo do centro de reação e contêm, cada uma, cinco α-hélices que atravessam a bicamada lipídica. Todas as hélices estão representadas como cilindros. A localização dos centros carreadores de elétrons, covalentemente ligados às subunidades proteicas, é mostrada em *preto,* exceto pelo par de moléculas de clorofila que são excitadas pela luz, as quais são mostradas em *verde-escuro.* Note que o citocromo se liga à superfície externa da membrana apenas por interações com as subunidades transmembrana (ver Figura 11-21 D). (Adaptada do desenho de J. Richardson, com base nos dados de J. Deisenhofer *et al.*, *Nature* 318: 618-624, 1985. Com permissão de Macmillam Publishers Ltd.)

propriedades mecânicas da membrana plasmática são determinadas por uma rede de proteínas fibrosas, chamadas de *córtex celular,* que se liga à superfície citosólica de membrana.

O córtex celular das hemácias humanas é uma estrutura relativamente simples e regular e a mais bem entendida. Hemácias são células pequenas com formato achatado característico (**Figura 11-30**). O principal componente do seu córtex é a proteína *espectrina,* longa, fina e flexível, de aproximadamente 100 nm de comprimento. Ela forma uma rede que provê suporte à membrana plasmática e mantém o formato celular. A rede de espectrina é conectada à membrana por meio de proteínas intracelulares de anexação que ligam as espectrinas a proteínas transmembrana específicas (**Figura 11-31**). A importância dessa rede pode ser observada em camundongos e humanos portadores de anomalias genéticas

QUESTÃO 11-6

Observe a estrutura do centro de reação fotossintética da Figura 11-29. Como é de se esperar, muitas α-hélices atravessam a membrana. No canto inferior direito, porém, há um segmento da cadeia polipeptídica da subunidade L que forma uma alça desordenada no interior do centro hidrofóbico da bicamada lipídica. Isso invalida a regra geral de que proteínas transmembrana atravessam a bicamada lipídica como α-hélices ou folhas β?

Figura 11-30 Hemácias humanas possuem formato achatado característico, como pode ser visto nesta micrografia eletrônica de varredura. Estas células não possuem núcleo nem outras organelas intracelulares. (Cortesia de Bernardette Chailley.)

Figura 11-31 Uma rede de espectrina forma o córtex celular nas hemácias humanas. (A) Dímeros de espectrina, juntamente com um pequeno número de moléculas de actina, formam uma rede justaposta à membrana plasmática pela ligação a pelo menos dois tipos de proteínas de anexação (mostradas aqui em *amarelo* e *azul),* que, por sua vez, se ligam a dois tipos de proteínas transmembrana (mostradas em *verde* e *marrom).* (B) Micrografia eletrônica mostrando a rede de espectrina na face citoplasmática da membrana de uma hemácia. A rede foi espichada para melhor observação de detalhes da sua estrutura; quando não espichada, a rede é muito mais compacta e ocuparia apenas um décimo dessa área. (B, cortesia de T. Byers e D. Branton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:6153– 6157, 1985. Com permissão da National Academy of Sciences.)

na estrutura da espectrina. Esses indivíduos são anêmicos: eles possuem menos hemácias do que o normal, além de elas serem esféricas, em vez de achatadas, e anormalmente frágeis.

Proteínas similares à espectrina e às proteínas intracelulares de anexação estão presentes no córtex da maioria das células de animais, mas o córtex, nessas células, é muito mais complexo de que o das hemácias. Enquanto hemácias precisam do córtex principalmente para obter suporte mecânico conforme circulam nos vasos sanguíneos, outras células precisam de seus córtices para modificar sua forma ativamente e se moverem, como discutido no Capítulo 17. Além disso, muitas células utilizam seus córtices para restringir a difusão de proteínas nas suas membranas, como veremos a seguir.

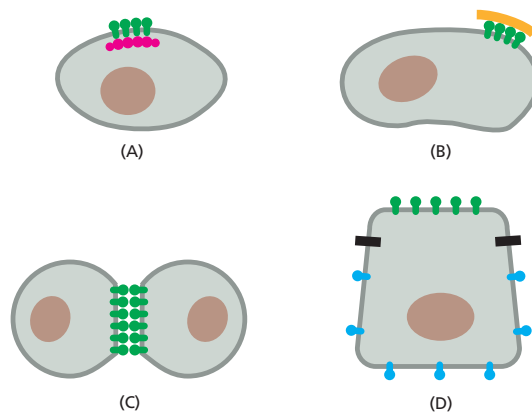
As células podem restringir o movimento das proteínas de membrana

Como a membrana é um líquido bidimensional, muitas das suas proteínas, assim como os lipídeos, podem mover-se livremente no plano da bicamada lipídica. Essa difusão pode ser observada na fusão de uma célula de camundongo com uma célula humana para formar uma célula híbrida com o dobro do tamanho de uma célula normal, e no monitoramento da distribuição das proteínas das membranas plasmáticas de cada uma das células originais. Em princípio, as proteínas humanas e do camundongo permanecem confinadas nas suas metades da nova célula; após aproximadamente meia hora, os dois conjuntos de proteínas começam a se misturar por toda a superfície celular (**Figura 11-32**).

QUESTÃO 11-7

Observe atentamente as proteínas transmembrana mostradas na Figura 11-31. O que se pode dizer acerca de sua mobilidade na membrana?

Figura 11-32 A formação de células híbridas de humanos e camundongos mostra que as proteínas de membrana podem mover-se lateralmente na bicamada lipídica. As proteínas de camundongo e humanas permanecem inicialmente confinadas em suas metades na recém-formada membrana plasmática da célula híbrida, mas se misturam logo após um curto período de tempo. Para marcar as proteínas, dois anticorpos foram ligados às proteínas humana e do camundongo e marcados com agentes fluorescentes diferentes (rodamina ou fluoresceína). Os dois anticorpos fluorescentes podem ser distinguidos no microscópio de fluorescência, pois a fluoresceína é *verde,* e a rodamina, *vermelha.* (Com base nas observações de L. D. Frye e M. Edidin, *J. Cell Sci.* 7:319-335, 1970. Com permissão de The Company of Biologists Ltd.)

Figura 11-33 **A mobilidade lateral das proteínas da membrana plasmática pode ser limitada de diversas maneiras.** Proteínas podem estar ligadas ao córtex celular dentro da célula (A), a moléculas da matriz extracelular (B), ou a proteínas da superfície de outra célula (C). Barreiras de difusão (mostradas como barras *pretas)* podem restringi-las a um domínio de membrana específico (D).

A imagem de uma membrana como um mar de lipídeos onde proteínas circulam livremente é muito simplista. Células possuem meios de confinar proteínas específicas da membrana plasmática em determinadas áreas da bicamada lipídica, criando regiões funcionalmente especializadas, ou **domínios de membrana**, na superfície da célula ou organela. Descrevemos algumas das técnicas modernas de estudo do movimento de proteínas de membrana em Como Sabemos, p. 382-383.

Conforme mostrado na Figura 11-33, proteínas de membrana podem estar ligadas a estruturas fixas fora da célula – por exemplo, a moléculas da matriz extracelular (discutido no Capítulo 20) – ou a estruturas intracelulares relativamente imóveis, especialmente ao córtex celular (ver Figura 11-31). Por fim, células podem criar barreiras que restrinjam componentes da membrana a um domínio específico. Nas células epiteliais do intestino, por exemplo, é importante que o transporte de proteínas envolvido na absorção de nutrientes do lúmen esteja restrito à superfície *apical* das células (a superfície voltada para o interior do intestino) e que outras proteínas envolvidas no transporte de solutos das células epiteliais para tecidos e para a corrente sanguínea estejam na superfície *basal* e *lateral* (Figura 11-34). Essa distribuição assimétrica de proteínas de membrana é mantida pela barreira formada pela linha de junção de células epiteliais adjacentes, chamada de *junção ocludente.* Nesses locais, proteínas de junção especializadas formam um cinturão contínuo ao redor da célula, onde ela faz contato com as células vizinhas, criando um local de selamento entre as membranas adjacentes (ver Figura 20-23). Proteínas de membrana não podem difundir-se por essas junções.

A superfície celular é revestida por carboidratos

Vimos que em células eucarióticas muitos dos lipídeos da camada externa da membrana plasmática possuem açúcares covalentemente ligados a eles. O

Figura 11-34 **Uma proteína de membrana é restrita a domínios específicos da membrana plasmática de uma célula epitelial do intestino.** A proteína A (na membrana apical) e a proteína B (nas membranas basal e lateral) podem difundir-se lateralmente nos seus domínios de membrana, mas não podem adentrar outros domínios pela limitação imposta por junções celulares especializadas, denominadas junções ocludentes.

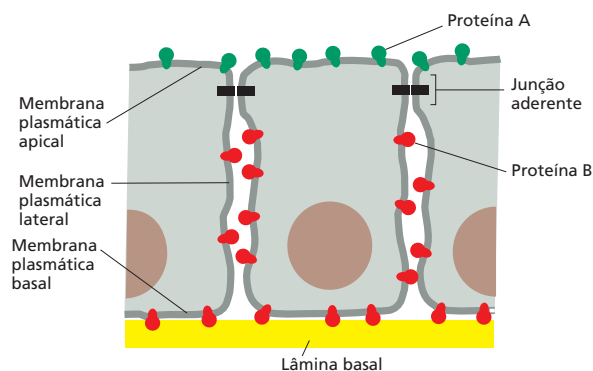
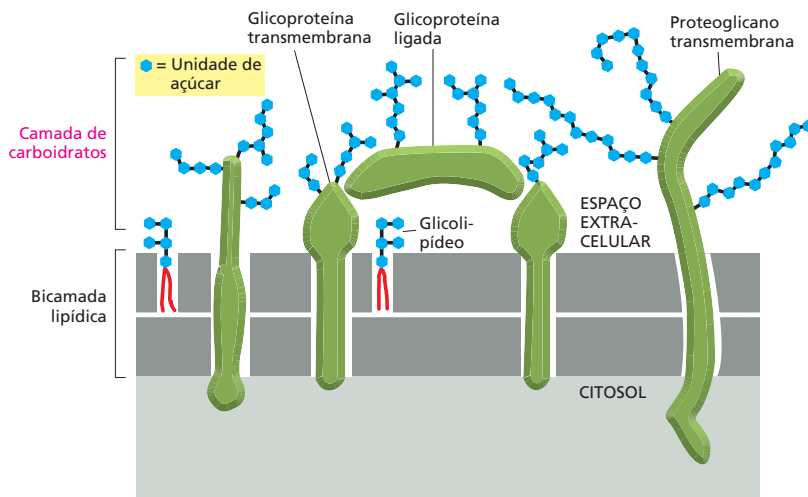



Figura 11-35 Células eucarióticas são revestidas por açúcares. A camada de carboidratos é formada por cadeias laterais de oligossacarídeos ligados a glicolipídeos de membrana e glicoproteínas e por cadeias polissacarídicas de proteoglicanos de membrana. Glicoproteínas e proteoglicanos que foram secretados pela célula e então adsorvidos em sua superfície podem também constituir a camada de carboidratos. Note que todos os carboidratos estão na superfície externa (não citosólica) da membrana plasmática.

mesmo pode ser dito para a maioria das proteínas da membrana plasmática. A maior parte dessas proteínas tem pequenas cadeias de açúcares, chamados de *oligossacarídeos,* ligadas a elas, e essas proteínas são então denominadas *glicoproteínas*. Outras proteínas de membrana possuem uma ou mais cadeias longas de polissacarídeos ligadas e são chamadas de *proteoglicanos.* Todo o carboidrato nas glicoproteínas, nos proteoglicanos e nos glicolipídeos está localizado em uma das faces da membrana, a não citosólica, onde forma uma cápsula de açúcares chamada de **camada de carboidratos** (Figura 11-35).

Por formar uma camada física sobre a bicamada lipídica, a camada de carboidratos ajuda a proteger a superfície celular de danos mecânicos e químicos. Como oligossacarídeos e polissacarídeos dessa camada absorvem água, eles conferem à célula uma superfície lubrificada. Essa camada ajuda as células móveis, como glóbulos brancos, a passar por espaços apertados além de evitar que as células do sangue se grudem umas nas outras ou às paredes dos vasos sanguíneos.

Os carboidratos da superfície celular fazem mais do que apenas proteger e lubrificar a célula. Eles possuem importante papel no reconhecimento e na adesão celular. Da mesma forma que muitas proteínas reconhecem e ligam sítios específicos de outras proteínas, algumas (denominadas *lectinas)* são especializadas no reconhecimento específico e na ligação a cadeias laterais de oligossacarídeos. As cadeias laterais dos oligossacarídeos presentes em glicoproteínas e glicolipídeos, apesar de curtas (tipicamente com menos de 15 unidades açúcar), são muito diversas. Diferentemente das cadeias polipeptídicas (proteínas), nas quais aminoácidos estão unidos linearmente por ligações peptídicas idênticas (ver Figura 11-22), açúcares podem estar ligados de diferentes formas e em sequências variadas, frequentemente formando cadeias ramificadas (ver Painel 2-3, p. 68-69). Mesmo apenas três grupos açúcar podem estar ligados covalentemente em combinações diferentes o suficiente para formar centenas de trissacarídeos.

Em um organismo multicelular, a camada de carboidrato pode também servir como sinal de distinção celular, como os uniformes de policiais, sendo característicos para células especializadas em uma função particular e que são reconhecidos pelas células com as quais devem interagir. Oligossacarídeos específicos da camada de carboidratos estão envolvidos, por exemplo, no reconhecimento do óvulo pelo esperma (discutido no Capítulo 19), também estão envolvidos nas respostas inflamatórias. Nos estágios inicias de infecções bacterianas, carboidratos da superfície de glóbulos brancos denominados *neutrófilos* são reconhecidos pela lectina das células endoteliais dos vasos sanguíneos no local da infecção. Esse processo de reconhecimento causa a aderência dos neutrófilos aos vasos sanguíneos e sua migração da corrente circulatória para os tecidos infectados, onde eles atuam na remoção da bactéria invasora (Figura 11-39).

COMO SABEMOS:
MEDINDO OS FLUXOS DA MEMBRANA

Uma característica essencial da bicamada lipídica é sua fluidez. Esse fluxo molecular vital é essencial para a integridade e a função das membranas celulares. Ele permite que as proteínas da membrana se desloquem na bicamada, associando-se e dissociando-se por meio de interações moleculares das quais a célula depende. A natureza dinâmica das membranas celulares é tão necessária para seu funcionamento correto que o seu modelo estrutural é comumente chamado de *modelo do mosaico fluido.*

Dada a importância na estrutura e na função da membrana, como mensuramos e estudamos a fluidez das membranas celulares? Os métodos mais comuns são visuais: algumas moléculas constituintes da membrana são marcadas, e seus movimentos, observados. Essa metodologia foi a primeira a demonstrar a difusão das proteínas de membrana previamente marcadas com anticorpos (ver Figura 11-32). Contudo, esse experimento deixou os pesquisadores com a impressão de que essas proteínas se difundiam livremente, sem restrições, em um oceano de lipídeos. Sabemos que essa imagem não é completamente correta. Para examinar a dinâmica da membrana mais profundamente, pesquisadores precisaram desenvolver métodos mais acurados para a observação dos movimentos das proteínas em membranas, como a membrana plasmática de células vivas.

A técnica FRAP

Uma dessas técnicas, chamada de *recobrimento fluorescente após fotoclareamento (flurescence recovery after photobleaching – FRAP),* envolve a marcação uniforme das proteínas da superfície celular, o clareamento da marcação em uma pequena porção desse mar de fluorescência e, então, a observação da velocidade com que as proteínas fluorescentes adjacentes se deslocam para a porção clareada da membrana. Inicialmente, a proteína de membrana de interesse é marcada com um grupo fluorescente específico. Essa marcação pode ser feita por meio de anticorpos fluorescentes ou pela fusão da proteína de membrana com proteínas fluorescentes como a proteína GFP *(green fluorescent protein)* utilizando técnicas de recombinação de DNA (discutido no Capítulo 10).

Uma vez que as células tenham sido marcadas, elas são dispostas sob um microscópio, e uma pequena porção da membrana é irradiada com um pulso intenso de *laser.* Esse tratamento clareia irreversivelmente os grupos fluorescentes no ponto irradiado, em uma área de 1 μm^2 da superfície celular (**Figura 11-36**). O tempo que as proteínas fluorescentes das áreas adjacentes à região clareada levam para migrar para essa região pode ser mensurado. O tempo dessa "recuperação da fluorescência" é a medida direta da taxa com que as proteínas adjacentes difundem na membrana (**Animação 11.5**). Esses experimentos revelaram que a membrana celular é tão viscosa quanto azeite de oliva.

Um a um

Um limitante da técnica de FRAP é que ela monitora o movimento de grandes quantidades de proteínas – centenas ou milhares – por áreas da membrana relativamente grandes. Com essa técnica, é impossível visualizar como

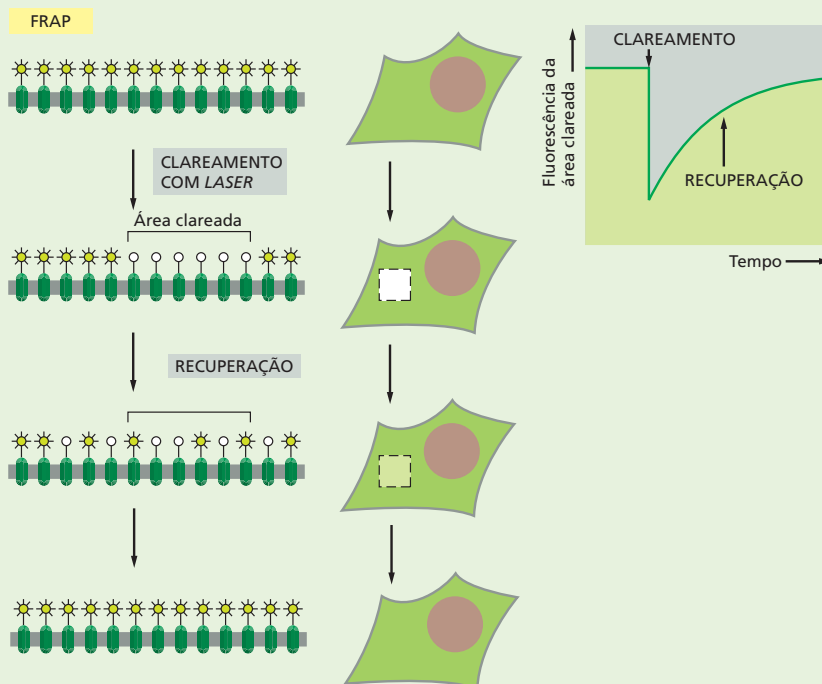



Figura 11-36 **Técnicas de fotoclareamento podem ser utilizadas para medir a taxa de difusão lateral de proteínas da membrana.** Uma proteína específica pode ser marcada com um anticorpo fluorescente (como mostrado aqui) ou ser expressa fundida com GFP, intrinsecamente fluorescente. Na técnica FRAP, moléculas fluorescentes são clareadas – descoloridas em uma pequena área da membrana, utilizando um *laser.* A intensidade de fluorescência dessa área é recuperada conforme as moléculas clareadas se difundem da área original e as moléculas não clareadas se difundem para a área irradiada (mostrada na figura vista de cima e em corte lateral). O coeficiente de difusão é calculado a partir do gráfico da taxa de recuperação: quanto maior o coeficiente de difusão de uma proteína de membrana, mais rápido é o recobrimento.

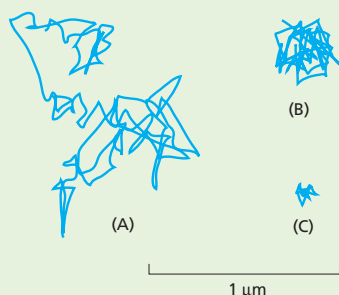



Figura 11-37 **Proteínas mostram diferentes padrões de movimento.** Estudos de rastreamento de uma única partícula revelaram o deslocamento de proteínas verdadeiras da superfície de células vivas. Aqui são mostradas algumas trajetórias representativas de diferentes proteínas da membrana plasmática. (A) Rastreamento de uma proteína livre para difundir-se aleatoriamente na membrana plasmática. (B) Rastreamento de uma proteína restrita a um pequeno domínio de membrana, por meio de associações com outras proteínas. (C) Rastreamento de uma proteína ancorada ao citoesqueleto e, portanto, essencialmente imóvel. O movimento das proteínas é monitorado na escala de tempo de segundos.

as moléculas se comportam individualmente. Caso uma proteína não migre para a zona clareada durante o experimento FRAP, por exemplo, isso ocorre porque a molécula é imóvel, ancorada em um ponto da membrana? Ou tem movimentos restritos a uma pequena área, limitados por proteínas do citoesqueleto – e dessa forma apenas parece ser imóvel?

Para solucionar esse problema, pesquisadores desenvolveram métodos de marcação e observação de movimento de moléculas individuais, ou de um pequeno conjunto de moléculas. Uma dessas técnicas, denominada *microscopia de rastreamento de uma única partícula (single-particle tracking – SPT),* baseia-se na marcação de moléculas proteicas com anticorpos recobertos por partículas de ouro. As esferas de ouro parecem pequenos pontos negros sob o microscópio, e seu movimento, e consequentemente o movimento das proteínas marcadas, pode ser rastreado por microscopia.

Pelos estudos já desenvolvidos, as proteínas de membrana podem fazer uma série de padrões de movimento, desde a difusão aleatória até a completa imobilidade (**Figura 11-37**). Algumas proteínas mostram combinações desses padrões.

Livre de células

Por fim, pesquisadores frequentemente desejam estudar o comportamento de algumas proteínas quando isoladas, na ausência de moléculas que possam restringir seus movimentos ou sua atividade. Para esses estudos, proteínas de membrana podem ser removidas das células e reconstituídas em vesículas artificiais de fosfolipídeos (**Figura 11-38**). Os lipídeos permitem que a proteína isolada mantenha suas propriedades estruturais, e a atividade e o comportamento dessas proteínas purificadas podem então ser analisados em detalhes.

Pode-se observar, a partir desses estudos, que as proteínas de membrana difundem mais livre e mais rapidamente nas bicamadas lipídicas artificiais do que nas membranas celulares. O fato de as proteínas mostrarem movimentos limitados nas membranas celulares faz sentido, uma vez que essas membranas estão cheias de proteínas e contêm uma grande variedade de lipídeos, muito maior do que as vesículas artificiais. Além disso, muitas proteínas de membrana podem estar ligadas a proteínas da matriz extracelular, ancoradas a elementos do citoesqueleto logo abaixo da membrana plasmática, ou ambos (como ilustrado na Figura 11-33).

Considerados juntos, esses estudos acerca dos movimentos das moléculas na bicamada lipídica revelam informações sobre a arquitetura e a organização da membrana celular, permitindo-nos montar um retrato mais acurado da membrana como um mosaico fluido dinâmico.

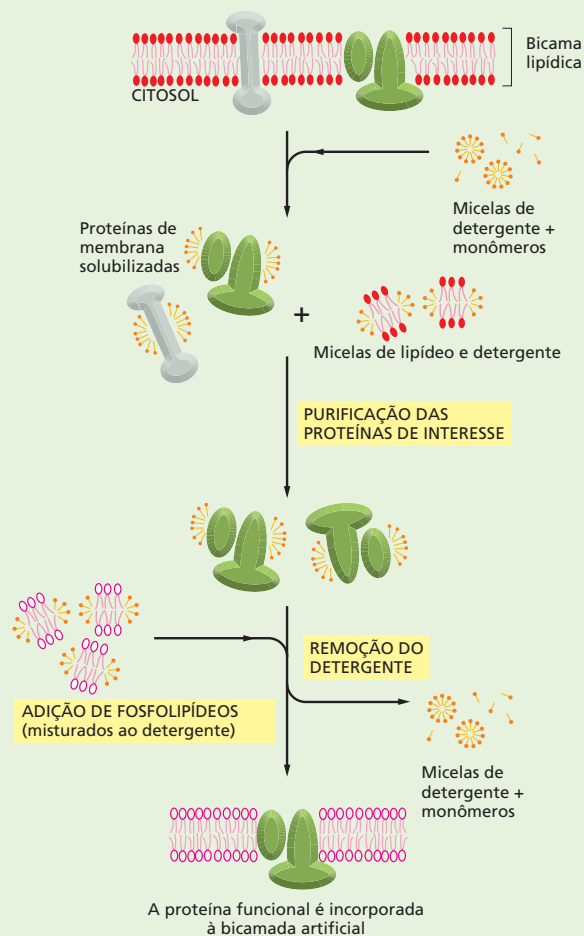



Figura 11-38 Detergentes suaves podem ser utilizados para solubilizar e reconstituir proteínas de membranas funcionais.

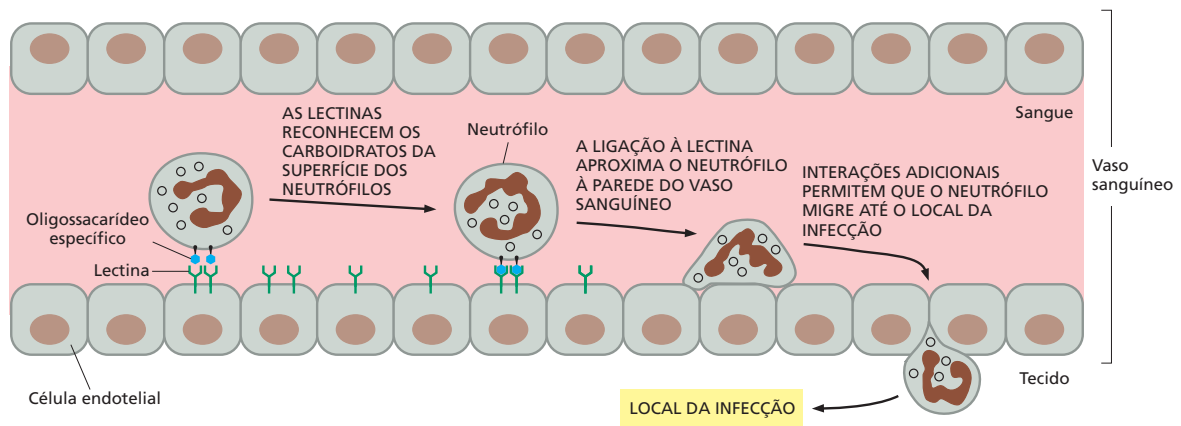



Figura 11-39 O reconhecimento de carboidratos da superfície celular de neutrófilos é o primeiro passo da sua migração do sangue para o local de infecção. Proteínas transmembrana especializadas (chamadas de lectinas) são produzidas pelas células da parede dos vasos sanguíneos (chamadas de células endoteliais) em resposta a sinais químicos oriundos dos locais de infecção. Essas proteínas reconhecem grupos açúcar específicos de glicolipídeos e glicoproteínas da superfície de neutrófilos circulantes na corrente sanguínea. Os neutrófilos então se aderem à parede do vaso sanguíneo. Essa associação não é muito forte, mas leva a outra, uma interação proteína-proteína muito forte (não mostrada) que ajuda na migração do neutrófilo para fora do vaso, por meio das células endoteliais, até o tecido do local de infecção (Animação 11.6).

Glicoproteínas são importantes membros da família de proteínas de membrana. No próximo capítulo, examinaremos com mais detalhes as funções complexas das proteínas transmembrana que atuam no transporte de moléculas para o interior e para o exterior da célula.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- **Membranas celulares permitem que a célula crie barreiras que confinam moléculas particulares em compartimentos específicos.**
- **Membranas celulares consistem em uma camada dupla – bicamada – e contínua de moléculas lipídicas na qual as proteínas estão embebidas.**
- **A bicamada lipídica provê a estrutura básica e a função de barreira para todas as membranas celulares.**
- **As moléculas lipídicas da membrana possuem porções hidrofóbicas e hidrofílicas. Elas se agrupam espontaneamente em bicamadas quando colocadas em água, formando compartimentos fechados que tornam a selar quando perfurados.**
- **Há três classes principais de moléculas de lipídeos de membrana: fosfolipídeos, esteróis e glicolipídeos.**
- **A bicamada lipídica é fluida, moléculas lipídicas podem difundir-se individualmente na sua monocamada; essas moléculas não podem, porém, trocar espontaneamente de uma monocamada para outra.**
- **As duas camadas da membrana plasmática possuem diferentes lipídeos na sua composição, refletindo as diferentes funções de cada face da membrana celular.**
- **Células ajustam a fluidez de suas membranas por meio da modificação dos lipídeos que as compõem.**
- **Proteínas de membrana são responsáveis pela maior parte das funções da membrana, como o transporte de pequenas moléculas solúveis em água através da bicamada lipídica.**
- **Proteínas transmembrana se estendem através da bicamada lipídica, geralmente sob a forma de uma ou mais α-hélices, mas também como folhas β dobradas na forma de um barril.**

- **Outras proteínas de membrana não atravessam a bicamada lipídica, mas estão ligadas a um dos lados da membrana, ou por associação não covalente a outras proteínas de membrana, ou ligadas covalentemente aos lipídeos de membrana.**
- **A maioria das membranas celulares são reforçadas por um arcabouço acessório de proteínas. Um exemplo é a rede de proteínas fibrosas que constitui o córtex celular; adjacente à membrana plasmática.**
- **Apesar de muitas proteínas de membrana poderem difundir-se rapidamente no plano da membrana, as células possuem meios de confinar proteínas em domínios específicos de membrana e de imobilizar determinadas proteínas ancorando-as a macromoléculas intra ou extracelulares.**
- **Muitas das proteínas e alguns dos lipídeos expostos na superfície da célula possuem cadeias de açúcar ligadas a eles; esses açúcares atuam na lubrificação e na proteção da superfície celular, além de estarem envolvidos em processos de reconhecimento celular.**

TERMOS-CHAVE

anfipático
bacteriorrodopsina
bicamada lipídica
camada de carboidratos
colesterol
detergente
domínio de membrana
fosfatidilcolina
fosfolipídeo
insaturada
membrana plasmática
proteína de membrana
saturada

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 11-8

Descreva os diferentes métodos que as células utilizam para restringir as proteínas a regiões específicas da membrana plasmática. Uma membrana com diversas proteínas ancoradas ainda pode ser considerada fluida?

QUESTÃO 11-9

Quais das seguintes afirmações estão corretas? Explique suas respostas.

A. Os lipídeos da bicamada lipídica giram rapidamente em torno de seus próprios eixos.
B. Os lipídeos da bicamada lipídica trocam de posição rapidamente uns com os outros no plano da membrana.
C. Os lipídeos da bicamada lipídica não fazem movimentos de *flip-flop* de uma monocamada para a outra.
D. Pontes de hidrogênio que se formam entre grupos da cabeça dos lipídeos e moléculas de água são continuamente quebradas e formadas novamente.
E. Glicolipídeos se deslocam entre diferentes compartimentos delimitados por membranas durante sua síntese, mas permanecem restritos a uma das faces da bicamada lipídica.
F. A margarina contém mais lipídeos saturados do que os óleos vegetais dos quais é feita.
G. Algumas proteínas de membrana são enzimas.
H. O revestimento de açúcar que recobre as células é denominado camada de carboidratos e torna as células mais viscosas.

QUESTÃO 11-10

O que significa o termo "líquido bidimensional"?

QUESTÃO 11-11

A estrutura da bicamada lipídica é determinada pelas propriedades particulares das suas moléculas lipídicas. O que aconteceria se:

A. Os fosfolipídeos tivessem apenas uma cauda hidrocarbonada e não duas?
B. As caudas hidrocarbonadas fossem mais curtas do que o normal, digamos com o comprimento de 10 átomos de carbono?
C. Todas as caudas hidrocarbonadas fossem saturadas?
D. Todas as caudas hidrocarbonadas fossem insaturadas?
E. A bicamada contivesse uma mistura de dois tipos de moléculas lipídicas, um com as duas caudas hidrocarbonadas saturadas e o outro tipo com as duas caudas hidrocarbonadas insaturadas?
F. Cada molécula lipídica fosse covalentemente ligada por meio de um átomo de carbono terminal de uma das caudas hidrocarbonadas a uma molécula de lipídeo da monocamada oposta?

QUESTÃO 11-12

Qual a diferença entre moléculas lipídicas e moléculas de detergente? Qual modificação precisaria ser feita em uma molécula lipídica para que se tornasse um detergente?

QUESTÃO 11-13

A. Moléculas lipídicas trocam de lugar com os lipídeos adjacentes a cada 10^{-7} segundos. Uma molécula lipídica difunde de uma ponta à outra de uma célula bacteriana de 2 μm de comprimento em cerca de 1 segundo. Esses números estão de acordo (assuma que o diâmetro da cabeça da molécula lipídica meça 0,5 nm)? Caso não estejam de acordo, qual seria o motivo dessa diferença?

B. Para avaliar a grande velocidade dos movimentos moleculares, assuma que a cabeça de uma molécula lipídica tenha aproximadamente o tamanho de uma bola de tênis de mesa (4 cm de diâmetro) e que o chão de uma sala-de-estar (6 m x 6 m) esteja coberto inteiramente por essas bolas. Se duas bolas adjacentes trocam de posição a cada 10^{-7} segundos, qual seria sua velocidade em quilômetros por hora? Quanto tempo uma bola levaria para atravessar a sala de uma parede à outra?

QUESTÃO 11-14

Por que a membrana de hemoglobinas precisa de proteínas?

QUESTÃO 11-15

Considere uma proteína transmembrana que forme um poro hidrofílico na membrana plasmática de uma célula eucariótica, permitindo a entrada de Na^+ quando ativada por um ligante específico, na face extracelular. O poro é composto por cinco subunidades transmembrana similares, cada uma contendo uma α-hélice que atravessa a membrana, com suas cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos voltados todos para um mesmo lado da hélice e suas cadeias laterais de aminoácidos hidrofílicos para o lado oposto. Considerando a função da proteína, de canal iônico que permite a entrada na célula de íons Na^+, proponha um arranjo possível para as cinco α-hélices na membrana.

QUESTÃO 11-16

Na membrana das hemácias humanas, a proporção de massa de proteínas (peso molecular médio de 50.000) para massa de fosfolipídeos (peso molecular 800), para colesterol (peso molecular 386) é de 2:1:1. Quantas moléculas de lipídeo existem para cada molécula proteica?

QUESTÃO 11-17

Desenhe um diagrama esquemático de duas membranas plasmáticas se aproximando durante a fusão celular, como mostrado na Figura 11-32. Mostre as proteínas da face externa da membrana de cada uma das células que foram marcadas com anticorpos fluorescentes de diferentes cores. Indique no seu desenho o destino desses marcadores com a fusão das células. Eles ainda estarão apenas na face externa da célula híbrida (A) após a fusão celular e (B) após a mistura das proteínas de membrana que ocorre durante a incubação a 37 °C? Qual seria o resultado do experimento se a incubação fosse feita a 0 °C?

QUESTÃO 11-18

Compare as forças hidrofóbicas que mantêm uma proteína de membrana na bicamada lipídica àquelas que ajudam no enovelamento das proteínas em uma estrutura tridimensional única.

QUESTÃO 11-19

Qual dos organismos abaixo terá a maior porcentagem de fosfolipídeos insaturados nas suas membranas? Explique sua resposta.

A. Peixes antárticos.

B. Cobras de desertos.

C. Seres humanos.

D. Urso polar.

E. Bactérias termofílicas que habitam fumarolas marinhas a 100 °C.

QUESTÃO 11-20

Qual das três sequências de aminoácidos mostradas a seguir, com o código de uma letra, é a melhor candidata a formar uma região transmembrana (α-hélice) em uma proteína transmembrana? Explique sua resposta.

A. I T L I Y F G N M S S V T Q T I L L I S

B. L L L I F F G V M A L V I V V I L L I A

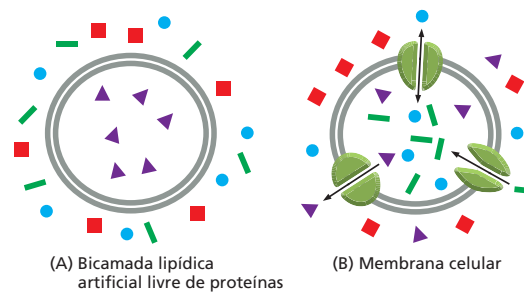
C. L L K K F F R D M A A V H E T I L E E S

CAPÍTULO 12

O Transporte de Membrana

As células vivem e crescem em função das trocas de moléculas com seu ambiente. A membrana plasmática funciona como uma barreira que controla o trânsito de moléculas para dentro e para fora da célula. Uma vez que o interior da bicamada lipídica é hidrofóbico, como vimos no Capítulo 11, a membrana plasmática tende a bloquear a passagem de quase todas as moléculas solúveis em água. No entanto, várias moléculas solúveis em água devem ser capazes de atravessar a membrana plasmática: as células devem importar nutrientes (como açúcares e aminoácidos), eliminar produtos residuais metabólicos (como CO_2) e regular as concentrações intracelulares de uma série de íons inorgânicos. Alguns desses solutos, como, por exemplo, CO_2 e O_2, podem simplesmente difundir-se através da bicamada lipídica, mas a grande maioria, não. Em vez disso, sua transferência depende de **proteínas de transporte de membrana** especializadas que se estendem através da membrana, propiciando corredores privativos ao longo da membrana para substâncias selecionadas (**Figura 12-1**).

Neste capítulo, consideraremos como as membranas controlam o tráfego de pequenas moléculas para dentro e para fora das células. As células também podem seletivamente transferir macromoléculas, como proteínas, através de suas membranas, mas esse transporte requer uma maquinaria mais elaborada e é discutido no Capítulo 15. Aqui, começaremos resumindo alguns dos princípios gerais que guiam a passagem de moléculas pequenas e solúveis em água através das membranas celulares. Em seguida, examinaremos as duas classes principais de proteínas de membrana que medeiam essa transferência. Um *transportador*, que possui partes móveis, pode deslocar pequenas moléculas de um lado ao outro da membrana pela mudança de sua forma. Os solutos transportados desse modo podem ser tanto moléculas orgânicas pequenas como íons inorgânicos. Os *canais*, por outro lado, formam minúsculos poros hidrofílicos na membrana, através dos quais os solutos podem passar por difusão. A maioria dos canais permite a passagem somente de íons inorgânicos, sendo denominados, portanto, *canais iônicos*. Uma vez que esses íons são eletricamente carregados, seus

Figura 12-1 As proteínas de transporte de membrana especializadas são responsáveis pela transferência de pequenas moléculas solúveis em água através das membranas celulares. Ao passo que as bicamadas lipídicas artificiais livres de proteínas são impermeáveis à maioria das moléculas solúveis em água (A), as membranas celulares não são (B). Note que cada tipo de proteína de transporte em uma membrana celular transfere um tipo específico de molécula, fazendo com que um conjunto seletivo de solutos acabe dentro do compartimento envolto por membrana.

movimentos podem criar forças elétricas potentes através da membrana. Na parte final do capítulo, discutiremos como essas forças possibilitam a comunicação entre as células nervosas, levando, em última análise, à surpreendente variação de comportamentos de que o cérebro humano é capaz.

OS PRINCÍPIOS DO TRANSPORTE DE MEMBRANA

A fim de estabelecer fundamentos para a discussão do transporte de membrana, primeiro consideraremos as diferenças de composição iônica entre o interior de uma célula e seu ambiente. Isso ajudará a esclarecer por que o transporte de íons tanto por transportadores como por canais iônicos é de importância fundamental às células.

As concentrações iônicas dentro de uma célula são muito diferentes daquelas fora da célula

As células vivas mantêm uma composição iônica interna que é muito diferente da composição iônica do líquido à sua volta, e essas diferenças são cruciais à sobrevivência e à atividade de uma célula. Íons inorgânicos, como Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^- e H^+ (prótons), são os mais abundantes de todos os solutos no ambiente de uma célula. Seus movimentos através das membranas celulares desempenham um papel essencial em muitos processos biológicos, incluindo a atividade de células nervosas, como discutiremos posteriormente neste capítulo, e a produção de ATP por todas as células, como discutido no Capítulo 14.

O Na^+ é o íon positivamente carregado (cátion) mais abundante do lado de fora da célula, e o K^+ é o mais abundante do lado de dentro (**Tabela 12-1**). Para que a célula não seja destruída por forças elétricas, a quantidade de carga positiva dentro dela deve ser balanceada por uma quantidade de carga negativa quase

TABELA 12-1 Uma comparação das concentrações iônicas dentro e fora de uma célula típica de mamífero

Componente	Concentração intracelular (mM)	Concentração extracelular (mM)
Cátions		
Na^+	5-15	145
K^+	140	5
Mg^{2+}	0,5	1-2
Ca^{2+}	10^{-4}	1-2
H^+	7×10^{-5} ($10^{-7,2}$ M ou pH 7,2)	4×10^{-5} ($10^{-7,4}$ M ou pH 7,4)
Ânions*		
Cl^-	5-15	110

* A célula deve conter quantidades iguais de cargas positivas e negativas (ou seja, ser eletricamente neutra). Assim, além de Cl^-, a célula contém muitos outros ânions que não estão listados nesta tabela; de fato, a maioria dos constituintes celulares é negativamente carregada (HCO_3^-, PO_4^{3-}, proteínas, ácidos nucleicos, metabólitos que transportam grupos fosfato e carboxila, etc). As concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} dadas correspondem aos íons livres. Há um total de aproximadamente 20 mM de Mg^{2+} e 1-2 mM de Ca^{2+} nas células, mas a maior parte está ligada a proteínas e outras substâncias e, no caso de Ca^{2+}, armazenada dentro de várias organelas.

exatamente igual, e o mesmo vale para a carga do líquido circundante. Contudo, excessos muito pequenos de carga positiva ou negativa, concentrados nas proximidades da membrana plasmática, de fato ocorrem, e eles têm um importante efeito elétrico, como discutiremos posteriormente. A alta concentração de Na^+ fora da célula é balanceada principalmente por Cl^- extracelular. A alta concentração de K^+ dentro da célula é balanceada por uma série de íons intracelulares negativamente carregados (ânions).

Essa distribuição diferencial de íons dentro e fora da célula é controlada em parte pela atividade de proteínas de transporte de membrana e em parte pelas características de permeabilidade da própria bicamada lipídica.

As bicamadas lipídicas são impermeáveis a solutos e íons

O interior hidrofóbico da bicamada lipídica cria uma barreira à passagem da maioria das moléculas hidrofílicas, incluindo os íons. Eles são tão relutantes para entrar em um ambiente gorduroso, assim como as moléculas hidrofóbicas são relutantes para entrar na água. Contudo, se houver tempo suficiente, praticamente todas as moléculas se difundirão através da bicamada lipídica. A *taxa* na qual elas se difundem, contudo, varia enormemente, dependendo do tamanho da molécula e de suas características de solubilidade. Em geral, quanto menor e mais lipossolúvel for a molécula (ou seja, quanto mais hidrofóbica ou apolar ela for), mais rapidamente ela se difundirá ao outro lado. Assim:

1. *Moléculas apolares pequenas*, como o oxigênio molecular (O_2, massa molecular de 32 dáltons) e o dióxido de carbono (44 dáltons), se dissolvem prontamente nas bicamadas lipídicas e, portanto, se difundem rapidamente através delas. As células necessitam dessa permeabilidade aos gases para os processos de respiração celular discutidos no Capítulo 14.
2. *Moléculas polares não carregadas* (moléculas com uma distribuição desigual de cargas elétricas) também se difundem rapidamente através de uma bicamada, se forem suficientemente pequenas. A água (18 dáltons) e o etanol (46 dáltons), por exemplo, atravessam relativamente rápido; o glicerol (92 dáltons) se difunde menos rapidamente, e a glicose (180 dáltons) dificilmente atravessa sob qualquer condição (**Figura 12-2**).
3. Em contrapartida, as bicamadas lipídicas são altamente impermeáveis a todos os *íons e moléculas carregadas*, qualquer que seja seu tamanho. A carga das moléculas e sua forte atração elétrica por moléculas de água inibem sua entrada na fase hidrocarbônica da bicamada. Assim, as bicamadas sintéticas são um bilhão (10^9) de vezes mais permeáveis à água do que a íons, ainda que pequenos como Na^+ ou K^+.

As membranas celulares permitem que a água e as moléculas apolares pequenas transpassem por difusão simples. Entretanto, para que as células adquiram nutrientes e possam liberar resíduos, as membranas também devem permitir a passagem de muitas outras moléculas, como íons, açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e muitos metabólitos celulares. Essas moléculas atravessam as bicamadas lipídicas muito lentamente por difusão simples; assim, proteínas de transporte de membrana especializadas são necessárias para transferi-las eficientemente através das membranas celulares.

Figura 12-2 A taxa na qual uma molécula se difunde através de uma bicamada lipídica sintética depende do seu tamanho e da sua solubilidade. Quanto menor a molécula e, mais significativamente, quanto menos interações favoráveis com a água ela tiver (ou seja, quanto menos polar ela for), mais rapidamente a molécula se difunde através da bicamada. Note que muitas das moléculas que a célula usa como nutrientes são demasiadamente grandes e polares para passar através de uma bicamada lipídica pura.

As proteínas de transporte de membrana se dividem em duas classes: transportadores e canais

As proteínas de transporte de membrana ocorrem em muitas formas e em todos os tipos de membranas biológicas. Cada proteína propicia um corredor privativo através da membrana para uma classe específica de molécula – íons, açúcares ou aminoácidos, por exemplo. A maioria desses portais proteicos é ainda mais exclusiva, permitindo somente a entrada de membros selecionados de uma classe molecular específica: alguns, por exemplo, são abertos a Na^+, mas não a K^+, outros a K^+, mas não a Na^+. O conjunto de proteínas de transporte de membrana

Figura 12-3 Moléculas pequenas e íons podem entrar na célula através de um transportador ou um canal. (A) Um transportador sofre uma série de mudanças conformacionais para transferir pequenas moléculas solúveis em água através da bicamada lipídica. (B) Um canal, em contrapartida, forma um poro hidrofílico de um lado ao outro da bicamada, através do qual íons inorgânicos específicos ou em alguns casos outras moléculas pequenas podem difundir-se. Como é de se esperar, os canais transferem moléculas a uma taxa muito maior do que os transportadores. Os canais iônicos podem existir em uma conformação aberta ou fechada, e eles transportam somente na conformação aberta, a qual é mostrada aqui. A abertura e o fechamento do canal são normalmente controlados por um estímulo externo ou por condições presentes dentro da célula.

presente na membrana plasmática, ou na membrana de uma organela intracelular, determina exatamente quais solutos podem passar para dentro e para fora daquela célula ou organela. Cada tipo de membrana, portanto, possui seu próprio conjunto característico de proteínas de transporte.

Como discutido no Capítulo 11, as proteínas de transporte de membrana que foram estudadas em detalhes possuem cadeias polipeptídicas que atravessam a bicamada lipídica múltiplas vezes – ou seja, elas são proteínas transmembrânicas de passagem múltipla (ver Figura 11-24). Acredita-se que, pelo cruzamento para frente e para trás através da bicamada, a cadeia polipeptídica forma um caminho contínuo, revestido por proteínas, que permite que pequenas moléculas hidrofílicas selecionadas atravessem a membrana sem entrar em contato direto com o interior hidrofóbico da bicamada lipídica.

As proteínas de transporte de membrana podem ser divididas em duas classes principais: transportadores e canais. A diferença básica entre os transportadores e os canais é o modo pelo qual eles distinguem os solutos, transportando alguns e outros não (**Figura 12-3**). Os **canais** distinguem principalmente com base no tamanho e na carga elétrica: se um canal está aberto, um íon ou uma molécula que é suficientemente pequena e carrega a carga apropriada pode passar, como por um alçapão estreito. Um **transportador**, por outro lado, permite somente a passagem daquelas moléculas ou íons que se encaixam em um sítio de ligação na proteína; ele, então, transfere essas moléculas através da membrana uma de cada vez pela mudança de sua própria conformação, funcionando mais como uma roleta para contagem de passageiros do que uma porta aberta. Os transportadores se ligam aos seus solutos com grande afinidade, do mesmo modo que uma enzima se liga ao seu substrato, e é esse requisito de ligação específica que torna o transporte seletivo.

Os solutos atravessam as membranas por transporte passivo ou ativo

Os transportadores e canais permitem que moléculas pequenas atravessem a membrana celular, mas o que controla se esses solutos se movem para dentro ou para fora da célula? Em muitos casos, a direção do transporte depende das concentrações relativas do soluto. As moléculas fluirão espontaneamente "morro abaixo" de uma região de alta concentração para uma região de baixa concentração, desde que haja um caminho. Tais movimentos são denominados *passivos*, porque não precisam de nenhuma outra força motora. Se, por exemplo, um soluto está presente em uma concentração mais alta fora da célula do que dentro dela e um canal ou transportador apropriado estiver presente na membrana plasmática, o soluto se moverá espontaneamente através da membrana ao longo de seu *gradiente de concentração* para dentro da célula por **transporte passivo** (às vezes denominado *difusão facilitada*), sem gasto de energia por sua proteína de transporte de membrana. Todos os canais e muitos transportadores funcionam como condutos para tal transporte passivo.

Contudo, para mover um soluto contra seu gradiente de concentração, uma proteína de transporte de membrana deve efetivamente trabalhar: ela tem de conduzir o fluxo "morro acima" pelo seu acoplamento a algum outro processo que fornece energia (como discutido no Capítulo 3 para as reações enzi-

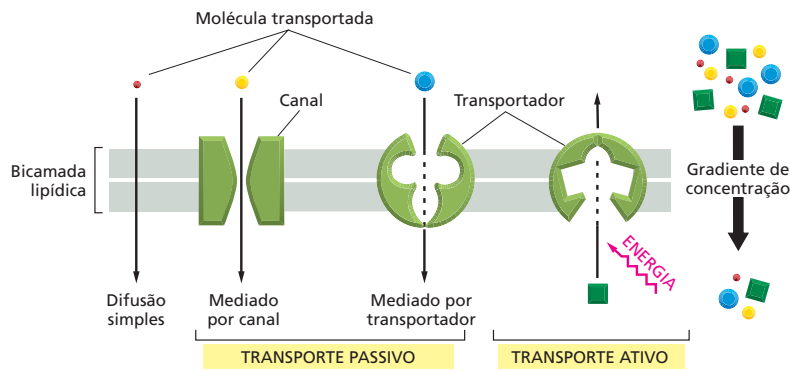



Figura 12-4 **A maioria dos solutos atravessa as membranas celulares por transporte passivo ou ativo.** Algumas moléculas não carregadas pequenas podem se mover ao longo de seu gradiente de concentração através da bicamada lipídica por difusão simples. Contudo, a maioria dos solutos necessita do auxílio de um canal ou transportador. Como indicado, o movimento de moléculas na mesma direção que o seu gradiente de concentração – transporte passivo – ocorre espontaneamente, ao passo que o transporte contra um gradiente de concentração – transporte ativo – requer a entrada de energia. Somente os transportadores podem efetuar o transporte ativo, mas tanto os transportadores como os canais podem efetuar o transporte passivo.

máticas). O movimento direcionado de solutos através da membrana é, desse modo, designado **transporte ativo**, e é efetuado somente por tipos especiais de transportadores que podem utilizar alguma fonte de energia para o processo de transporte (**Figura 12-4**). Uma vez que direcionam o transporte de solutos contra seu gradiente de concentração, muitos desses transportadores são denominados *bombas*. Agora, examinaremos uma série de transportadores, tanto ativos como passivos, e veremos como eles operam no movimento de moléculas através das membranas celulares.

OS TRANSPORTADORES E SUAS FUNÇÕES

Os transportadores são necessários à movimentação de quase todas as moléculas orgânicas pequenas através das membranas celulares, com exceção das moléculas solúveis em gordura e de moléculas não carregadas pequenas que podem passar diretamente através da bicamada lipídica por difusão simples (ver Figura 12-2). Cada transportador é altamente seletivo, com frequência transferindo só um tipo de molécula. Para guiar e impulsionar o complexo tráfego de moléculas pequenas para dentro e para fora da célula e entre o citosol e as diferentes organelas envoltas por membrana, cada membrana celular contém um conjunto de diferentes transportadores apropriados àquela membrana específica. Por exemplo: a membrana plasmática contém transportadores que importam nutrientes, como açúcares, aminoácidos e nucleotídeos; a membrana dos lisossomos contém um transportador de H^+ que acidifica o interior lisossômico, e a membrana interna das mitocôndrias contém transportadores para a importação do piruvato que as mitocôndrias usam como combustível na geração de ATP e para a exportação do ATP que é sintetizado (**Figura 12-5**).

Embora os mecanismos moleculares detalhados que formam a base da movimentação de solutos sejam conhecidos somente para alguns transportadores, os princípios gerais que governam a função dessas proteínas são bem compreendidos.

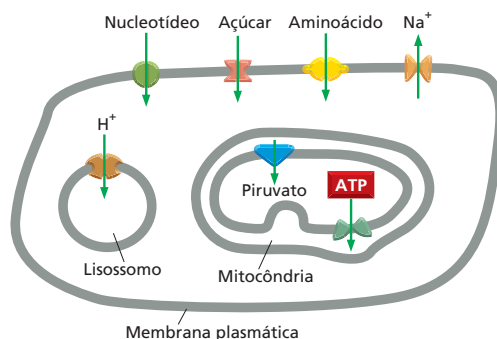
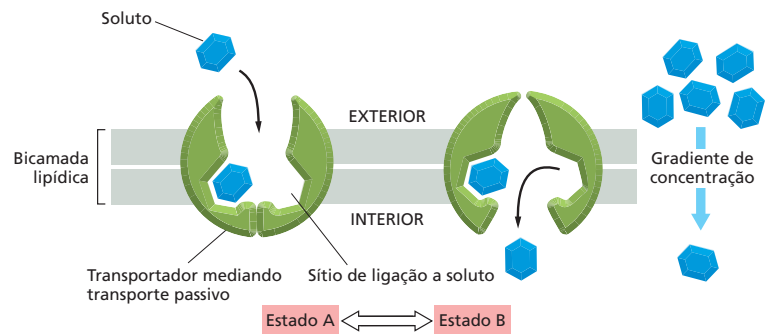



Figura 12-5 **Cada membrana celular possui seu próprio conjunto característico de transportadores.**

Figura 12-6 Uma mudança conformacional em um transportador pode mediar o transporte passivo de solutos, como a glicose. Neste modelo, o transportador pode existir em dois estados conformacionais: no estado A, os sítios de ligação para o soluto estão expostos do lado de fora da membrana; no estado B, os mesmos sítios estão expostos do outro lado da membrana. Propõe-se que a transição entre os dois estados ocorra aleatória e independentemente do fato de o soluto estar ligado, além de ser completamente reversível. Se a concentração do soluto for mais alta do lado de fora da membrana, ele será com frequência mais capturado em transições A → B que o transportam para dentro da célula do que em transições B → A que o transportam para fora. Portanto, haverá um transporte líquido do soluto ao longo de seu gradiente de concentração.

Os gradientes de concentração e as forças elétricas direcionam o transporte passivo

Os solutos podem atravessar a membrana por transporte passivo ou ativo – e os transportadores são capazes de facilitar ambos os tipos de movimento (ver Figura 12-4). Um exemplo simples de um transportador que medeia o transporte passivo é o *transportador de glicose* encontrado na membrana plasmática das células hepáticas de mamíferos e de muitos outros tipos celulares. A proteína consiste em uma cadeia polipeptídica que atravessa a membrana pelo menos 12 vezes. Acredita-se que o transportador possa adotar pelo menos duas conformações, alterando-se reversível e aleatoriamente entre elas. Em uma conformação, o transportador expõe sítios de ligação para glicose ao exterior da célula; na outra, ele expõe esses sítios ao interior da célula (**Figura 12-6**).

Quando o açúcar é abundante do lado de fora de uma célula hepática (após uma refeição), as moléculas de glicose se ligam aos sítios de ligação exibidos externamente do transportador. Quando a proteína altera a conformação, ela carrega essas moléculas para dentro, liberando-as no citosol, onde a concentração de glicose é baixa. Por outro lado, quando os níveis de açúcar no sangue são baixos (quando você está com fome), o hormônio glucagon estimula a célula hepática a produzir grandes quantidades de glicose pela degradação do glicogênio. Em consequência, a concentração de glicose é mais alta dentro da célula do que fora, e a glicose se liga a qualquer sítio de ligação exibido internamente do transportador. Quando a proteína altera a conformação na direção oposta, a glicose é transportada para fora da célula. O fluxo de glicose pode, assim, seguir qualquer caminho, de acordo com a direção do gradiente de concentração de glicose através da membrana: para dentro, se a glicose está mais concentrada fora da célula do que dentro, e para fora, se o oposto for verdade. Os transportadores desse tipo, que permitem um fluxo de soluto, mas não desempenham nenhum papel na determinação de sua direção, efetuam o transporte passivo. Embora passivo, o transporte é altamente seletivo: os sítios de ligação no transportador de glicose se ligam somente à D-glicose e não, por exemplo, à sua imagem especular L-glicose, a qual a célula não pode usar para a glicólise.

Para a glicose, que é uma molécula não carregada, a direção do transporte passivo é determinada somente por seu gradiente de concentração. Para moléculas eletricamente carregadas, tanto íons orgânicos pequenos como íons inorgânicos, uma força adicional entra em ação. Por razões que explicaremos posteriormente, a maioria das membranas celulares possui uma voltagem através delas, uma diferença no potencial elétrico em cada lado da membrana, a qual é denominada *potencial de membrana*. Essa diferença de potencial exerce uma força sobre qualquer molécula que carrega uma carga elétrica. O lado citoplasmático da membrana plasmática tem normalmente um potencial negativo em relação ao lado de fora, e isso tende a puxar os solutos positivamente carregados para dentro da célula e a impelir aqueles negativamente carregados para fora. Ao mesmo tempo, um soluto carregado também tenderá a se mover de acordo com seu gradiente de concentração.

QUESTÃO 12-1

Uma reação enzimática simples pode ser descrita pela equação $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$, onde E é a enzima; S, o substrato; P, o produto, e ES, o complexo enzima-substrato.

A. Escreva uma equação correspondente que descreva o funcionamento de um transportador (T) que medeie o transporte de um soluto (S) ao longo de seu gradiente de concentração.
B. O que essa equação lhe informará sobre a função de um transportador?
C. Por que essa equação seria uma descrição inadequada da função de um canal?

A força líquida que impele um soluto através da membrana é, portanto, uma combinação de duas forças, uma que se deve ao gradiente de concentração e a outra que se deve à voltagem através da membrana. Essa força motora líquida é denominada **gradiente eletroquímico** de um dado soluto. Esse gradiente determina a direção do transporte passivo através da membrana. Para alguns íons, a voltagem e o gradiente de concentração funcionam na mesma direção, criando um gradiente eletroquímico relativamente alto (**Figura 12-7A**). Esse é o caso do Na^+, que é positivamente carregado e ocorre em uma concentração mais alta do lado de fora das células do que em seu interior. Portanto, se tiver oportunidade, o Na^+ tende a entrar nas células. Se, no entanto, a voltagem e os gradientes de concentração tiverem efeitos opostos, o gradiente eletroquímico resultante pode ser pequeno (Figura 12-7B). Esse é o caso do K^+, um íon positivamente carregado que está presente em uma concentração muito mais alta dentro das células do que em seu exterior. Em virtude desses efeitos opostos, o K^+ possui um gradiente eletroquímico pequeno através da membrana, apesar do seu grande gradiente de concentração, e por isso há pouco movimento líquido de K^+ através da membrana.

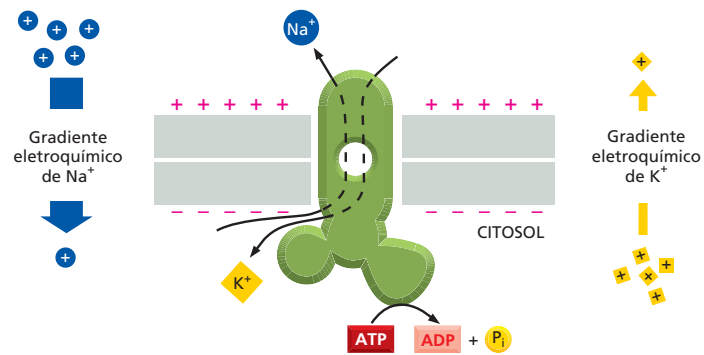
Figura 12-7 Um gradiente eletroquímico possui dois componentes. A força motora líquida (o gradiente eletroquímico) que tende a mover um soluto carregado (íon) através de uma membrana é a soma do gradiente de concentração do soluto e da voltagem através da membrana (o potencial de membrana, que é representado aqui pelos sinais + e – na membrana). A largura da seta *verde* representa a magnitude do gradiente eletroquímico para um soluto positivamente carregado em duas situações diferentes. Em (A), o gradiente de concentração é suplementado por um potencial de membrana que aumenta a força motora. Em (B), o potencial de membrana age contra o gradiente de concentração, diminuindo a força motora para o movimento do soluto.

O transporte ativo move solutos contra seus gradientes eletroquímicos

Naturalmente, as células não podem depender somente do transporte passivo. O transporte ativo de solutos contra seu gradiente eletroquímico é essencial para manter a composição iônica intracelular das células e para importar solutos que estão em uma concentração mais baixa do lado de fora do que do lado de dentro da célula. As células executam o transporte ativo por meio de três modos principais (**Figura 12-8**): (i) Os *transportadores acoplados* ligam o transporte desfavorável de um soluto através da membrana ao transporte favorável de outro. (ii) As *bombas movidas por ATP* acoplam o transporte desfavorável à hidrólise de ATP. (iii) As *bombas movidas à luz*, as quais são encontradas principalmente em células bacterianas, acoplam o transporte desfavorável a uma entrada de energia oriunda da luz, como discutido no caso da bacteriorrodopsina (ver Figura 11-28).

Como uma substância tem de ser carregada "morro acima" antes de poder fluir "morro abaixo", as diferentes formas de transporte ativo estão necessariamente ligadas. Assim, na membrana plasmática de uma célula animal, uma bomba movida por ATP transporta o Na^+ para fora da célula contra seu gradiente eletroquímico, e esse Na^+ pode então fluir de volta para dentro, de acordo com seu gradiente eletroquímico. Como o íon flui através de transportadores acoplados a Na^+, o influxo de Na^+ propicia uma fonte de energia que direciona o movimento ativo de muitas outras substâncias para dentro da célula contra seus gradientes eletroquímicos. Se a bomba de Na^+ cessasse de operar, o gradiente de Na^+ decairia rapidamente, e o transporte por meio de transportadores acoplados a Na^+ seria interrompido. Portanto, a bomba de Na^+ movida por ATP desempenha um papel central no transporte de membrana nas células animais. Nas células vegetais, nos fungos e em muitas bactérias, um papel similar é desempenhado por bombas de

Figura 12-8 As células direcionam o transporte ativo por meio de três modos principais. A molécula transportada ativamente é mostrada em *amarelo*, e a fonte de energia é mostrada em *vermelho*.

Figura 12-9 A bomba de Na^+-K^+ desempenha um papel central no transporte de membrana nas células animais. Este transportador usa a energia da hidrólise de ATP para bombear Na^+ para fora da célula e K^+ para dentro, ambos contra seus gradientes eletroquímicos, ainda que o gradiente eletroquímico de K^+ seja próximo a zero.

H^+ movidas por ATP que criam um gradiente eletroquímico de íons H^+ pelo bombeamento de H^+ para fora da célula, como discutiremos posteriormente.

As células animais usam a energia da hidrólise de ATP para bombear Na^+ para fora

Nas células animais, a bomba de Na^+ movida por ATP faz a hidrólise de ATP em ADP para transportar Na^+ para fora da célula; essa bomba, portanto, não é só um transportador, mas também uma enzima – uma ATPase. Ao mesmo tempo, a proteína acopla o transporte de Na^+ para fora ao transporte de K^+ para dentro. Portanto, a bomba é comumente conhecida como *ATPase de Na^+-K^+* ou **bomba de Na^+-K^+** (Figura 12-9).

Esse transportador desempenha um papel central na economia de energia das células animais, sendo tipicamente responsável por 30% ou mais de seu consumo total de ATP. Como uma bomba de esgotamento no porão de um navio com infiltração de água, ela opera de modo ininterrupto para expelir o Na^+ que está constantemente entrando através de outros transportadores e canais iônicos. Dessa maneira, a bomba mantém a concentração de Na^+ no citosol cerca de 10-30 vezes mais baixa do que no líquido extracelular e a concentração de K^+ cerca de 10-30 vezes mais alta (ver Tabela 12-1). Em condições normais, o potencial elétrico do interior da maioria das células é negativo em comparação ao meio externo, de modo que os íons positivos tendem a ser puxados para dentro da célula. Isso significa que a força motora eletroquímica de Na^+ para dentro é grande, uma vez que ela inclui a força motora causada pelo gradiente de concentração e uma força motora na mesma direção causada pelo gradiente de voltagem (ver Figura 12-7A).

O Na^+ presente no exterior da célula, no lado desfavorável de seu gradiente eletroquímico, se assemelha a um grande volume de água atrás de uma represa alta: ele representa um estoque muito grande de energia (Figura 12-10). Ainda que se interrompa artificialmente a operação da bomba de Na^+-K^+ com uma toxina, como o glicosídeo vegetal *ouabaína*, a energia desse estoque é suficiente para sustentar por muitos minutos os outros processos de transporte que são direcionados pelo fluxo favorável de Na^+.

A situação é diferente para o K^+. A força elétrica é a mesma que para o Na^+, pois ela depende somente da carga carregada pelo íon. Contudo, o gradiente de concentração está na direção oposta. O resultado, em condições normais, é que a força motora líquida para o movimento de K^+ através da membrana é próxima a zero: a força elétrica que puxa o K^+ para dentro da célula é quase inteiramente balanceada pelo gradiente de concentração que tende a conduzi-lo para fora.

Figura 12-10 O Na^+ no exterior da célula é como a água atrás de uma represa alta. A água na represa possui energia potencial, a qual pode ser usada para impulsionar processos que requerem energia. Da mesma forma, um gradiente iônico através de uma membrana pode ser usado para impulsionar processos ativos em uma célula, incluindo o transporte ativo de outras moléculas. Aqui é mostrada a represa de Blyde River, na África do Sul. (Cortesia de Paul Franklin. Com permissão de Oxford Scientific Films.)

A bomba de Na^+-K^+ é movida pela adição transitória de um grupo fosfato

A bomba de Na^+-K^+ fornece uma bela ilustração de como uma proteína acopla uma reação à outra, segundo os princípios discutidos no Capítulo 3. A bomba

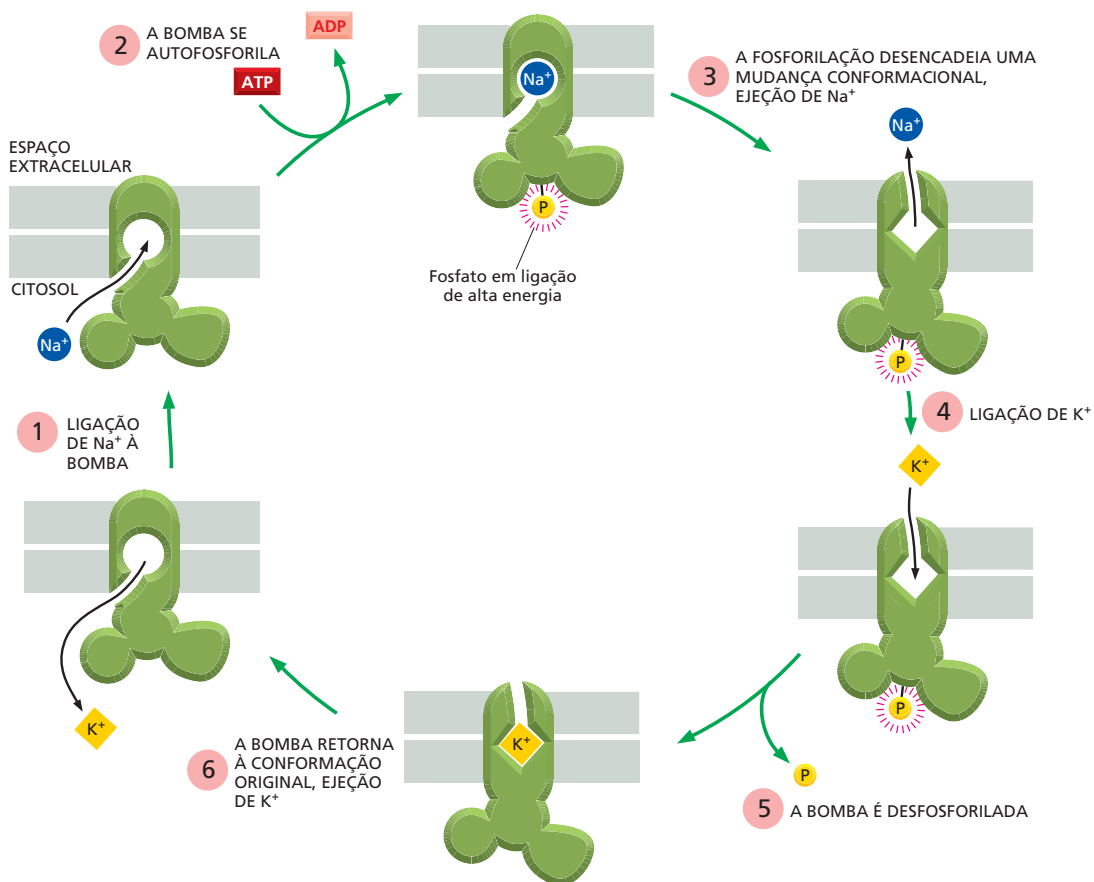
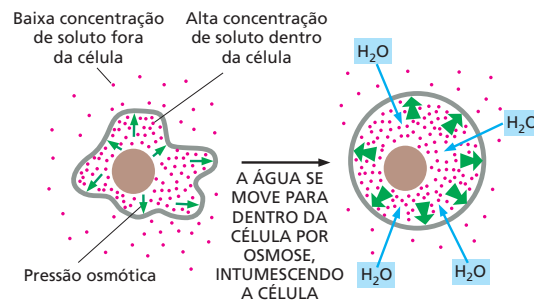



Figura 12-11 **A bomba de Na^+-K^+ transporta íons de forma cíclica.** A ligação de Na^+ citosólico (1) e a subsequente fosforilação por ATP da face citosólica da bomba (2) induzem a proteína a uma mudança conformacional que transfere o Na^+ através da membrana, liberando-o no exterior (3). A ligação de alta energia do fosfato à proteína fornece a energia para conduzir a mudança conformacional. A ligação de K^+ na superfície extracelular (4) e a subsequente desfosforilação (5) restituem a conformação original da proteína, a qual transfere o K^+ através da membrana, liberando-o no citosol (6). O ciclo é mostrado na **Animação 12.1**. As mudanças na conformação são análogas às transições A $\rightleftharpoons$ B mostradas na Figura 12-6, com exceção de que aqui a fosforilação dependente de Na^+ e a desfosforilação dependente de K^+ da proteína fazem com que as transições conformacionais ocorram de forma ordenada, permitindo que a proteína execute trabalho útil. A título de simplicidade, somente um sítio de ligação a Na^+ e um a K^+ são mostrados. Na bomba real em células de mamíferos, acredita-se que existam três sítios de ligação a Na^+ e dois a K^+. Portanto, o resultado líquido de um ciclo da bomba é o transporte de três Na^+ para fora da célula e dois K^+ para dentro. A ouabaína inibe a bomba impedindo a ligação de K^+.

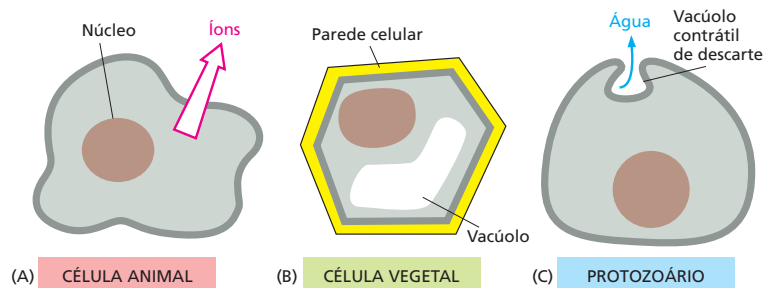
funciona em um ciclo, como ilustrado esquematicamente na **Figura 12-11**. O Na^+ se liga à bomba em sítios expostos no interior da célula (estágio 1), ativando a atividade de ATPase. O ATP é rompido, com a liberação de ADP e a transferência de um grupo fosfato para dentro de uma ligação de alta energia à própria bomba – ou seja, a bomba se autofosforila (estágio 2). A fosforilação causa uma mudança de conformação da bomba, de forma a liberar Na^+ na superfície exterior da célula e, ao mesmo tempo, expor um sítio de ligação para K^+ na mesma superfície (estágio 3). A ligação de K^+ extracelular (estágio 4) desencadeia a remoção do grupo fosfato (estágio 5), fazendo com que a bomba retorne à sua conformação original e descarregando o K^+ no interior da célula (estágio 6). Todo o ciclo, o qual leva cerca de 10 milissegundos, pode, então, ser repetido. Cada etapa do ciclo depende da anterior, de modo que, se ocorrer o impedimento de qualquer uma das etapas individuais, todas as funções da bomba serão interrompidas. Esse acoplamento firme assegura que a bomba opere somente quando os íons apropriados estão disponíveis para o transporte, evitando, com isso, a hidrólise desnecessária de ATP.

Figura 12-12 A difusão da água é conhecida como osmose. Se a concentração de solutos dentro de uma célula for maior do que aquela no exterior, a água se moverá para dentro por osmose, fazendo com que a célula inche. Contudo, se uma célula for colocada em uma solução de alta concentração salina, a água se moverá para fora (**Animação 12.2**).

A bomba de Na^+-K^+ ajuda a manter o balanço osmótico das células animais

A membrana plasmática é permeável à água (ver Figura 12-2), e, se a concentração total de solutos for baixa em um lado da membrana e alta no outro, a água tenderá a se mover através dela até que as concentrações de soluto sejam iguais. O movimento da água de uma região de baixa concentração de soluto (alta concentração de água) para uma região de alta concentração de soluto (baixa concentração de água) é denominado **osmose**. As células contêm canais especializados de água (denominados *aquaporinas*) em suas membranas plasmáticas que facilitam esse fluxo. A força motora para o movimento da água é equivalente a uma diferença em pressão de água e é denominada **pressão osmótica**. Na ausência de qualquer pressão contrária, o movimento osmótico da água para dentro de uma célula ocasionará seu intumescimento (**Figura 12-12**).

Nos tecidos do corpo animal, as células são banhadas por um líquido que é rico em solutos, especialmente Na^+ e Cl^-. Isso equilibra a concentração de solutos orgânicos e inorgânicos confinados dentro da célula. O balanço osmótico sempre corre o risco de ser perturbado, uma vez que os solutos externos estão constantemente escoando para dentro da célula a favor de seus gradientes eletroquímicos individuais. Assim, a fim de manter o equilíbrio osmótico, as células animais têm de trabalhar continuamente, bombeando para fora solutos indesejáveis (**Figura 12-13A**). Essa função é realizada principalmente pela bomba de Na^+-K^+, a qual bombeia para fora o Na^+ que escoa para dentro. Ao mesmo tempo, a bomba de Na^+-K^+ ajuda a manter o potencial de membrana (como explicaremos posteriormente). Esse potencial de membrana tende a impedir a entrada de Cl^-, o qual é negativamente carregado e precisaria se mover contra o gradiente elétrico gerado pela bomba para entrar na célula.

As diferentes células lidam de modos diferentes com os problemas osmóticos. As paredes celulares resistentes das células vegetais impedem que as mesmas intumesçam, de modo que elas podem tolerar grandes diferenças osmóticas ao longo de suas membranas plasmáticas (Figura 12-13B). A parede celular exerce uma pressão contrária que tende a equilibrar a pressão osmótica criada pelos solutos na célula e, assim, limita o movimento de água para dentro da célula. A osmose, juntamente com o transporte ativo de íons para dentro da célula, resulta em uma *pressão de turgor* que mantém as células vegetais dilatadas com

Figura 12-13 As células usam diferentes táticas para evitar o intumescimento osmótico. A célula animal mantém a concentração intracelular de solutos baixa pelo bombeamento de íons para fora (A). A parede resistente da célula vegetal impede seu intumescimento (B). O protozoário evita o intumescimento pela ejeção periódica da água que se move para dentro da célula (C).

água, com sua parede celular tensa. Desse modo, as células vegetais se assemelham a bolas de futebol, nas quais o revestimento externo de couro é mantido esticado pela pressão no balão de borracha interno (que está cheio); a parede celular funciona como o revestimento externo de couro, e a membrana plasmática funciona como o balão de borracha. A pressão de turgor tem várias funções. Ela mantém os caules das plantas rígidos e as folhas estendidas. Ela também desempenha um papel na regulação das trocas gasosas por meio dos estômatos – as "bocas" microscópicas na superfície de uma folha; esses poros são abertos e fechados pelas células-guarda que os rodeiam (**Figura 12-14**). As células-guarda controlam sua própria pressão de turgor pela regulação do movimento de K^+ através de suas membranas plasmáticas.

Em alguns protozoários que vivem na água doce, como as amebas, o excesso de água que flui continuamente para dentro da célula por osmose é coletado em vacúolos contráteis que descarregam periodicamente seu conteúdo no exterior (Figura 12-13C). A célula primeiramente permite que o vacúolo se encha com uma solução rica em solutos, o que faz com que a água os siga por osmose. A célula, então, recupera os solutos bombeando-os ativamente de volta para o citosol antes de esvaziar o vacúolo no exterior.

Figura 12-14 Os estômatos se abrem do lado debaixo de uma folha. A abertura e o fechamento desses poros são controlados pelas células-guarda em forma de salsicha que os rodeiam. (Cortesia de Kim Findlay.)

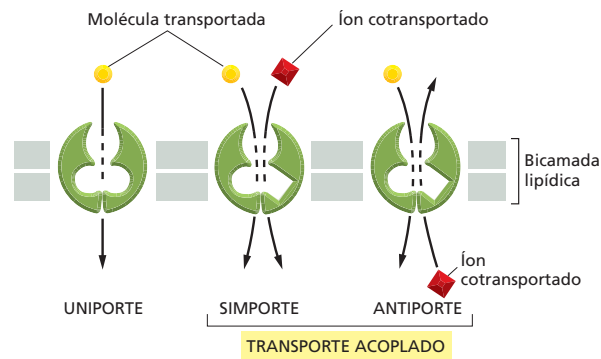
As baixas concentrações intracelulares de Ca^{2+} são mantidas por bombas de Ca^{2+}

O Ca^{2+}, assim como o Na^+, também é mantido a uma baixa concentração no citosol comparado com sua concentração no líquido extracelular, mas é muito menos abundante do que o Na^+, tanto no interior como no exterior das células. O movimento de Ca^{2+} através das membranas celulares, entretanto, é crucialmente importante, porque o Ca^{2+} pode ligar-se muito firmemente a uma série de proteínas na célula, alterando suas atividades. Um influxo de Ca^{2+} para dentro do citosol através dos canais de Ca^{2+}, por exemplo, é frequentemente usado como um sinal para desencadear outros eventos intracelulares, como a secreção de moléculas sinalizadoras e a contração de células musculares.

Quanto menor a concentração basal de Ca^{2+} livre no citosol, mais sensível é a célula a um aumento no Ca^{2+} citosólico. Desse modo, as células eucarióticas em geral mantêm concentrações muito baixas de Ca^{2+} livre em seu citosol (cerca de 10^{-4} mM), apesar das concentrações extracelulares de Ca^{2+} muito mais altas (tipicamente 1-2 mM). Essa enorme diferença de concentração é obtida principalmente por meio de bombas de Ca^{2+} movidas por ATP tanto na membrana plasmática como na membrana do retículo endoplasmático, as quais bombeiam ativamente Ca^{2+} para fora do citosol.

Como a bomba de Na^+-K^+, a bomba de Ca^{2+} é uma ATPase que é fosforilada e desfosforilada durante seu ciclo de bombeamento (**Figura 12-15**). Acredita-se

Figura 12-15 Uma bomba de Ca^{2+} restitui o Ca^{2+} ao retículo sarcoplasmático em uma célula muscular esquelética. A estrutura tridimensional dessa proteína transportadora de membrana foi determinada por cristalografia por raios X e microscopia eletrônica. A bomba de cálcio é uma única proteína composta de quatro domínios discretos com funções diferentes. Quando uma célula muscular é estimulada, o Ca^{2+} jorra do retículo sarcoplasmático – uma forma especializada do retículo endoplasmático – para o citosol, permitindo que a célula se contraia; para se recuperar da contração, o Ca^{2+} é restituído ao retículo sarcoplasmático por essa bomba de Ca^{2+}. A cadeia polipeptídica da proteína cruza a membrana na forma de 10 α-hélices. A ligação de ATP e a consequente fosforilação de um ácido aspártico no transportador desencadeiam mudanças conformacionais que colocam o domínio de ligação de nucleotídeo e o domínio ativador em proximidade estreita. Esse movimento, por sua vez, leva a um rearranjo das hélices transmembrânicas, o que elimina os sítios de ligação de Ca^{2+} e libera os íons Ca^{2+} no lúmen do retículo sarcoplasmático. Note que a rota tomada pelos íons Ca^{2+} através da proteína permite que os íons evitem contato com a bicamada lipídica. (Adaptada de C. Toyoshima *et al.*, *Nature* 405:647-655, 2000. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Figura 12-16 Alguns transportadores carregam um único soluto através da membrana (uniporte); outros acoplam o transporte "morro acima" (desfavorável) de um soluto através da membrana ao transporte "morro abaixo" (favorável) de outro. No transporte acoplado, os solutos podem ser transferidos na mesma direção (simporte) ou na direção oposta (antiporte) (**Animação 12.3**). Uniportes, simportes e antiportes são usados tanto no transporte passivo como no transporte ativo.

que ela funcione de modo muito semelhante ao descrito para a bomba de Na^+-K^+ na Figura 12-11, exceto que ela retorna à sua conformação original sem a ligação nem o transporte de um segundo íon. Essas duas bombas movidas por ATP possuem sequências de aminoácidos e estruturas similares, sugerindo que compartilham uma origem evolutiva comum.

Os transportadores acoplados exploram gradientes para adquirir nutrientes ativamente

Um gradiente de qualquer soluto através de uma membrana, como o gradiente de Na^+ gerado pela bomba de Na^+-K^+, pode ser usado para abastecer o transporte ativo de uma segunda molécula. O movimento favorável do primeiro soluto ao longo de seu gradiente fornece energia para direcionar o transporte desfavorável do segundo. Os transportadores que realizam isso são denominados **transportadores acoplados** (ver Figura 12-8). Eles podem acoplar o movimento de um íon inorgânico ao de outro, o movimento de um íon inorgânico ao de uma molécula orgânica ou o movimento de uma molécula orgânica ao de outra. Se o transportador desloca os dois solutos na mesma direção através da membrana, ele é denominado *simporte* (**Figura 12-16**). Se ele os desloca em direções opostas, é denominado *antiporte*. Um transportador que transporta somente um tipo de soluto através da membrana (e, portanto, não é um transportador acoplado) é denominado *uniporte*. O transportador passivo de glicose descrito anteriormente (ver Figura 12-6) é um uniporte.

Em células animais, um papel especialmente importante é desempenhado pelos simportes que usam o influxo de Na^+ a favor de seu elevado gradiente eletroquímico para direcionar a importação de outros solutos para dentro da célula. As células epiteliais que revestem o intestino, por exemplo, transferem glicose do intestino através do epitélio intestinal. Se essas células possuíssem apenas os transportadores passivos de glicose (uniportes) descritos, elas liberariam glicose no intestino após uma refeição livre de açúcares tão facilmente como elas absorvem glicose do intestino após uma refeição rica em açúcares. No entanto, essas células epiteliais também possuem um *simporte de glicose-*Na^+, o qual pode ser usado para absorver glicose do lúmen intestinal por transporte ativo, mesmo quando a concentração de glicose é mais alta dentro da célula do que no intestino. Como o gradiente eletroquímico para Na^+ é elevado, quando o Na^+ se move para dentro da célula a favor de seu gradiente, o açúcar é, de certo modo, "dragado" para dentro da célula com ele (**Figura 12-17**). Como a ligação de Na^+ e glicose é cooperativa – a ligação de um estimula a ligação do outro –, ambas as moléculas devem estar presentes para que o transporte acoplado ocorra.

Contudo, se as células epiteliais intestinais possuíssem *apenas* esse simporte, elas nunca poderiam liberar glicose para o uso das outras células do corpo. Essas células, portanto, possuem dois tipos de transportadores de glicose. No domínio apical da membrana plasmática, o qual se volta para o lúmen do intestino, elas possuem os simportes de glicose-Na^+, que absorvem glicose ativa-

QUESTÃO 12-2

Um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} causa a contração das células musculares. Além de uma bomba de Ca^{2+} movida por ATP, as células musculares que se contraem rápida e regularmente, como as do coração, possuem um antiporte que troca Ca^{2+} por Na^+ extracelular através da membrana plasmática. A maioria dos íons Ca^{2+} que entrar na célula durante a contração é rapidamente bombeada de volta para fora da célula por esse antiporte, permitindo, assim, que a célula relaxe. A ouabaína e os digitálicos são usados no tratamento de pacientes com doenças cardíacas porque fazem com que o músculo cardíaco se contraia mais fortemente. Ambos os fármacos funcionam pela inibição parcial da bomba de Na^+-K^+ na membrana das células musculares cardíacas. Você pode propor uma explicação para os efeitos desses fármacos nos pacientes? O que acontecerá se uma quantidade excessiva de um desses fármacos for administrada?

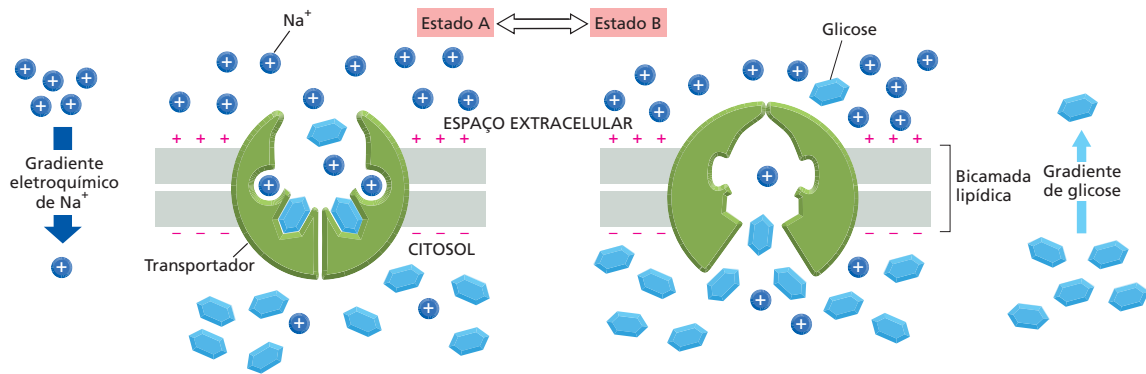



Figura 12-17 A proteína simporte de glicose-Na$^+$ usa o gradiente eletroquímico de Na$^+$ para direcionar a importação de glicose. A glicose pode ser movida através das membranas das células epiteliais, usando tanto transportadores ativos como passivos. Aqui está mostrado um modo pelo qual a proteína simporte de glicose-Na$^+$ poderia ativamente bombear glicose através da membrana usando o influxo de Na$^+$ a favor de seu gradiente eletroquímico para direcionar o transporte de glicose. A bomba oscila aleatoriamente entre dois estados alternados, A e B. No estado A, a proteína está aberta ao espaço extracelular; no estado B, ela está aberta ao citosol. Embora o Na$^+$ e a glicose se liguem à proteína em qualquer um dos dois estados, eles se ligam efetivamente apenas se ambos estiverem simultaneamente presentes: a ligação de Na$^+$ induz uma mudança conformacional na proteína que aumenta muito a afinidade da proteína por glicose e vice-versa. Como a concentração de Na$^+$ é muito mais alta no espaço extracelular do que no citosol, é mais provável que a glicose se ligue à bomba no estado A; consequentemente, tanto o Na$^+$ como a glicose entram na célula (através de uma transição A → B) com muito mais frequência do que saem dela (através de uma transição B → A). O resultado geral é o transporte líquido tanto de glicose como de Na$^+$ para dentro da célula. Note que, como a ligação é cooperativa, se um dos dois solutos estiver ausente, o outro deixará de se ligar à bomba e não será transportado. Um modo alternativo pelo qual o transporte acoplado pode funcionar é considerado na Questão 12-3.

mente, criando uma alta concentração de glicose no citosol. Nos domínios basal e lateral da membrana plasmática, elas possuem os uniportes passivos de glicose, que liberam a glicose a favor de seu gradiente de concentração para o uso de outros tecidos (**Figura 12-18**). Os dois tipos de transportadores de glicose são mantidos separados em seus domínios apropriados da membrana plasmática por uma barreira de difusão formada por uma junção aderente ao redor do ápice

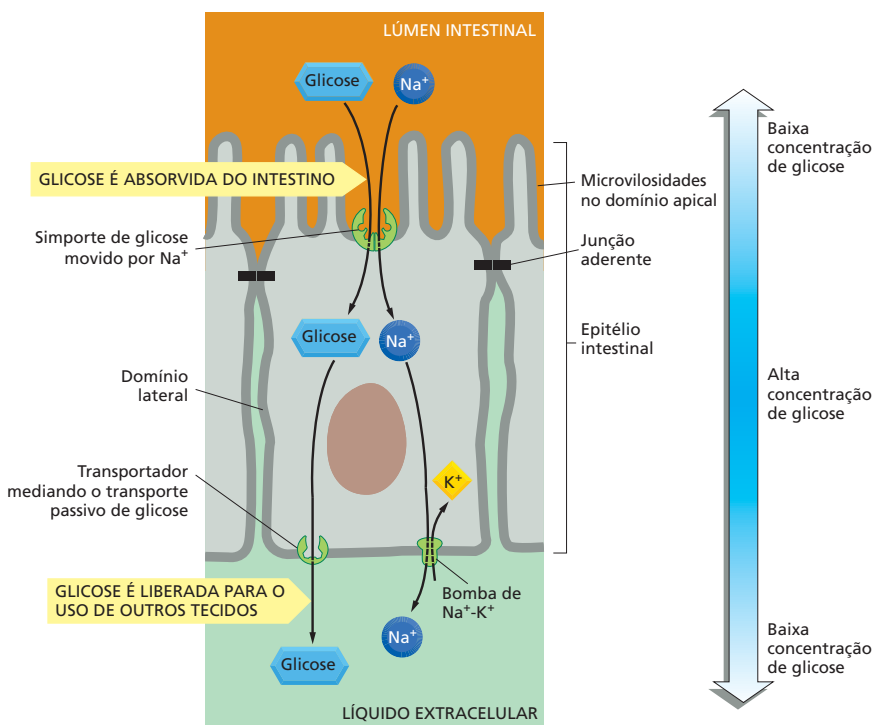



Figura 12-18 Dois tipos de transportadores de glicose possibilitam que as células epiteliais intestinais transfiram glicose através do revestimento intestinal. A glicose é ativamente transportada para dentro da célula por simportes de glicose movidos por Na$^+$ na superfície apical e é liberada da célula a favor de seu gradiente de concentração por uniportes passivos de glicose nas superfícies basal e lateral (**Animação 12.4**). Os dois tipos de transportadores de glicose são mantidos separados na membrana plasmática pela junção aderente. (Ver Figura 11-34; discutiremos as junções compactas mais adiante no Capítulo 20.) Para que a concentração de Na$^+$ no citosol seja mantida baixa, o Na$^+$ que entra na célula, via o simporte de glicose movido por Na$^+$, é bombeado para fora por bombas de Na$^+$-K$^+$. Há bastante Na$^+$ no lúmen intestinal, fornecido pela dieta.

QUESTÃO 12-3

Uma proteína transmembrana possui as seguintes propriedades: ela possui dois sítios de ligação, um para o soluto A e um para o soluto B. A proteína pode sofrer uma mudança conformacional e alternar entre dois estados: ou ambos os sítios de ligação estão expostos exclusivamente em um lado da membrana, ou ambos os sítios de ligação estão expostos exclusivamente no outro lado da membrana. A proteína pode alternar entre os dois estados conformacionais somente se ambos os sítios de ligação estiverem ocupados ou se ambos os sítios de ligação estiverem vazios, mas não pode alternar se somente um sítio de ligação estiver ocupado.

A. Que tipo de proteína essas propriedades definem?
B. Você precisa especificar quaisquer propriedades adicionais para transformar essa proteína em um simporte que acopla o movimento do soluto A contra seu gradiente de concentração ao movimento do soluto B a favor de seu gradiente eletroquímico?
C. Escreva um conjunto de regras que define um antiporte.

da célula, a qual impede a mistura dos componentes de membrana entre os domínios apical, lateral e basal, como discutido no Capítulo 11 (ver Figura 11-34).

As células do revestimento do intestino e de muitos outros órgãos, como o rim, contêm uma série de simportes em suas membranas plasmáticas que são similarmente direcionados pelo gradiente eletroquímico de Na^+. Cada um desses transportadores importa especificamente um pequeno grupo de açúcares ou aminoácidos relacionados para dentro da célula. Contudo, os antiportes movidos por Na^+ também são importantes ao funcionamento celular. Por exemplo, o *trocador de Na^+-H^+* das membranas plasmáticas de muitas células animais usa o influxo favorável de Na^+ para bombear H^+ para fora da célula, sendo um dos principais dispositivos que as células animais usam para controlar o pH em seu citosol.

Os gradientes de H^+ são usados para direcionar o transporte de membrana em plantas, fungos e bactérias

As células vegetais, os fungos (incluindo as leveduras) e as bactérias não possuem bombas de Na^+-K^+ em suas membranas plasmáticas. Em vez de um gradiente eletroquímico de Na^+, elas dependem principalmente de um gradiente eletroquímico de H^+ para direcionar o transporte de solutos para dentro da célula. O gradiente é criado por bombas de H^+ na membrana plasmática, as quais bombeiam H^+ para fora da célula e, assim, estabelecem um gradiente eletroquímico de prótons, com níveis mais altos de H^+ no exterior do que no interior. Durante o processo, a bomba de H^+ também cria um pH ácido no meio circundante à célula. A absorção de muitos açúcares e aminoácidos para o interior das células bacterianas, então, é direcionada por simportes de H^+, os quais usam o gradiente eletroquímico de H^+ ao longo da membrana plasmática de modo muito semelhante ao uso do gradiente eletroquímico de Na^+ pelas células animais.

Em algumas bactérias fotossintéticas, o gradiente de H^+ é criado pela atividade de bombas de H^+ movidas à luz, como a bacteriorrodopsina (ver Figura 11-28). Em outras bactérias, o gradiente é criado pelas atividades de proteínas da membrana plasmática que realizam os estágios finais da respiração celular que levam à síntese de ATP, como discutido no Capítulo 14. Todavia, as plantas, os fungos e muitas outras bactérias estabelecem seus gradientes de H^+ por meio de ATPases em suas membranas plasmáticas que usam a energia da hidrólise de ATP para bombear H^+ para fora da célula. Essas ATPases se assemelham às bombas de Na^+-K^+ e às bombas Ca^{2+} das células de mamíferos discutidas anteriormente.

Um tipo diferente de ATPase de H^+ é encontrado nas membranas de algumas organelas intracelulares, como os lisossomos das células animais e o vacúolo central das células de plantas e de fungos. A sua função é bombear H^+ do citosol para dentro da organela, ajudando, desse modo, a manter o pH do citosol neutro e o pH do interior da organela ácido. O ambiente ácido é crucial ao funcionamento de muitas organelas, como discutiremos no Capítulo 15.

Alguns dos transportadores considerados neste capítulo são mostrados na **Figura 12-19** e listados na **Tabela 12-2**.

Agora, trataremos do transporte de íons através de canais e discutiremos como esse fluxo de íons pode gerar um potencial de membrana.

OS CANAIS IÔNICOS E O POTENCIAL DE MEMBRANA

Em princípio, o modo mais simples de permitir que uma pequena molécula hidrossolúvel atravesse de um lado ao outro de uma membrana é criar um canal hidrofílico através do qual a molécula possa passar. Os canais desempenham essa função nas membranas celulares, formando poros aquosos transmembrânicos que permitem o movimento passivo de pequenas moléculas hidrossolúveis para dentro ou para fora da célula ou organela.

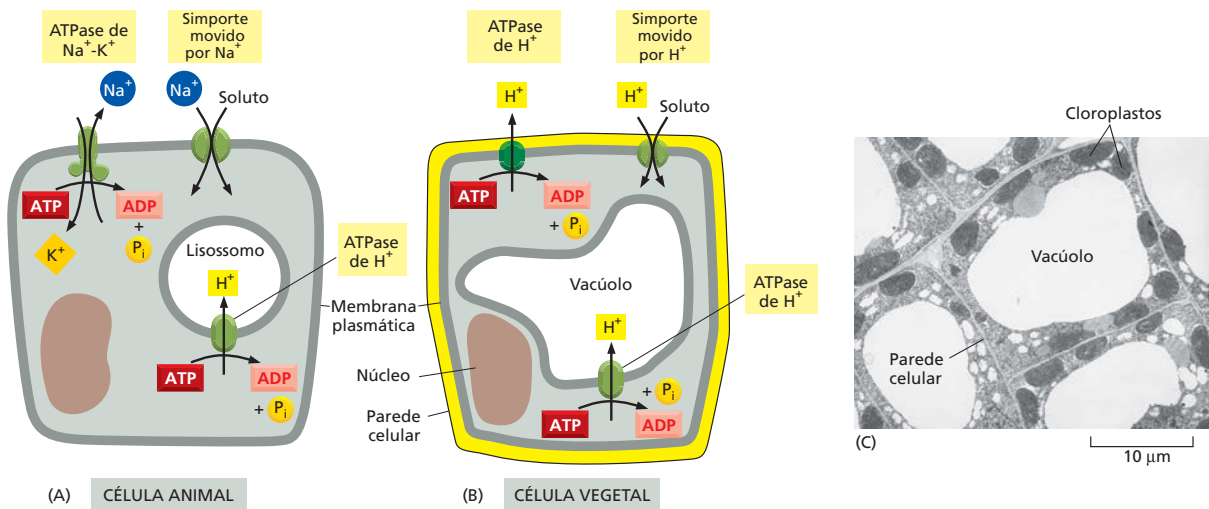



Figura 12-19 Há similaridades e diferenças no movimento de solutos mediado por transportadores em células animais e vegetais. Em células animais, um gradiente eletroquímico de Na^+, gerado pela bomba de Na^+-K^+ (ATPase de Na^+-K^+), é frequentemente usado para direcionar o transporte ativo de solutos através da membrana plasmática (A). Um gradiente eletroquímico de H^+, em geral estabelecido por uma ATPase de H^+, é, com frequência, usado para esse fim em células vegetais (B), assim como em bactérias e fungos (não mostrado). Os lisossomos nas células animais e os vacúolos nas células de plantas e fungos contêm uma ATPase de H^+ em suas membranas, a qual bombeia H^+ para dentro, ajudando a manter o ambiente interno dessas organelas ácido. (C) Micrografia eletrônica mostrando o vacúolo em células vegetais de uma folha jovem de tabaco. (C, cortesia de J. Burgess.)

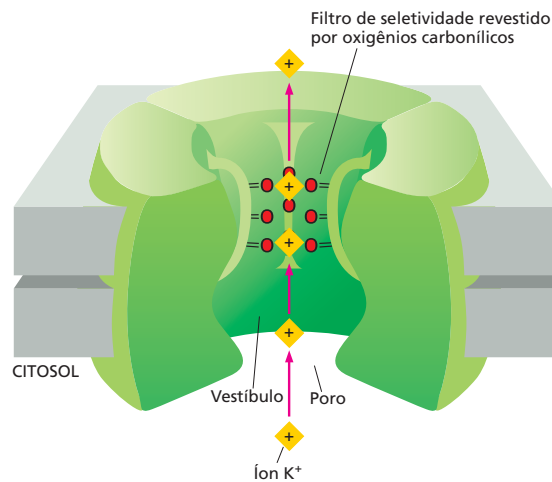
Alguns canais formam poros relativamente grandes: por exemplo, as proteínas que formam as *junções comunicantes* entre duas células adjacentes (ver Figura 21-28) e as *porinas* que formam canais na membrana externa das mitocôndrias e de algumas bactérias (ver Figura 11-25). Entretanto, tais canais grandes e permissivos levariam a vazamentos desastrosos se conectassem diretamente o citosol de uma célula ao espaço extracelular. Assim, a maioria dos canais na membrana plasmática das células animais e vegetais possui poros estreitos e altamente seletivos. Um canal especializado, denominado *aquaporina*, facilita o fluxo de água através da membrana plasmática. A estrutura dessa proteína permite a passagem rápida de moléculas não carregadas de água, ao passo que proíbe o movimento de íons, incluindo H^+. Contudo, a maioria dos canais da célula possibilita o transporte de íons inorgânicos, principalmente Na^+, K^+, Cl^- e Ca^{2+}. Discutiremos esses **canais iônicos** a seguir.

Os canais iônicos são seletivos e controlados

Duas propriedades importantes distinguem os canais iônicos de orifícios simples na membrana. Primeiro, eles exibem *seletividade iônica*, permitindo que alguns

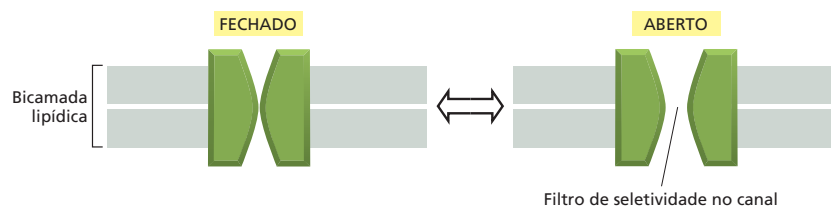
TABELA 12-2 Alguns exemplos de transportadores

Transportador	Localização	Fonte de energia	Função
Transportador de glicose	Membrana plasmática da maioria das células animais	Nenhuma	Importação passiva de glicose
Bomba de glicose movida por Na^+	Membrana plasmática apical de células do rim e intestino	Gradiente de Na^+	Importação ativa de glucose
Trocador de Na^+-H^+	Membrana plasmática de células animais	Gradiente de Na^+	Exportação ativa de íons H^+, regulação de pH
Bomba de Na^+-K^+ (ATPase de Na^+-K^+)	Membrana plasmática da maioria das células animais	Hidrólise de ATP	Exportação ativa de Na^+ e importação de K^+
Bomba de Ca^{2+} (ATPase de Ca^{2+})	Membrana plasmática de células eucarióticas	Hidrólise de ATP	Exportação ativa de Ca^{2+}
Bomba de H^+ (ATPase de H^+)	Membrana plasmática de células de plantas, fungos e algumas bactérias	Hidrólise de ATP	Exportação ativa de H^+
Bomba de H^+ (ATPase de H^+)	Membranas de lisossomos em células animais e de vacúolos em células de plantas e fungos	Hidrólise de ATP	Exportação ativa de H^+ do citosol para dentro do vacúolo
Bacteriorrodopsina	Membrana plasmática de algumas bactérias	Luz	Exportação ativa de H^+

Figura 12-20 Um canal de K^+ possui um filtro de seletividade que controla qual íon será transportado através da membrana. Uma porção de um canal de K^+ bacteriano é mostrada aqui. Uma das quatro subunidades proteicas foi omitida do desenho para expor a estrutura interior do poro. Do lado citosólico, o poro se abre em um vestíbulo que se situa no meio da membrana. Os íons K^+ no vestíbulo ainda estão cobertos com suas moléculas de água associadas (não mostrado). O filtro de seletividade estreito, o qual liga o vestíbulo com o exterior da célula, está revestido por átomos de oxigênio carbonílico (*vermelho*) que portam uma carga negativa parcial e formam sítios de ligação transitórios para os íons K^+ que se desprenderam de sua camada aquosa. (Adaptada de D. A. Doyle *et al.*, *Science* 280:69-77, 1998. Com permissão de AAAS.)

íons inorgânicos passem, mas outros, não. A seletividade iônica depende do diâmetro e da forma do canal iônico e da distribuição dos aminoácidos carregados que o revestem. Um canal iônico é suficientemente estreito em certos lugares para forçar o contato dos íons com a parede do canal, de modo que somente aqueles de tamanho e carga apropriados são capazes de passar (**Figura 12-20**). Canais estreitos, por exemplo, não darão passagem a íons grandes, e canais com um revestimento negativamente carregado impedirão a entrada de íons negativos, em virtude da repulsão eletrostática mútua entre cargas iguais. Desse modo, desenvolveram-se canais que são seletivos para apenas um tipo de íon, como Cl^- ou K^+ (**Animação 12.5**). Cada íon em solução aquosa é cercado por uma pequena camada de moléculas de água, e os íons têm de desprender-se da maioria de suas moléculas de água associadas, a fim de passarem, em fila indiana, através do filtro de seletividade na parte mais estreita do canal. Nesse local, os íons fazem contatos importantes, mas muito transitórios, com átomos dos aminoácidos que revestem as paredes do filtro de seletividade (ver Figura 12-20). Esses átomos precisamente posicionados permitem que o canal discrimine entre íons que diferem muito pouco em tamanho. Essa etapa no processo de transporte também limita a taxa máxima de passagem dos íons através do canal. Assim, à medida que as concentrações iônicas aumentam, o fluxo de íons através de um canal primeiro aumenta proporcionalmente, mas depois se nivela (satura) a uma taxa máxima.

A segunda distinção importante entre poros simples e canais iônicos é que os canais iônicos não estão continuamente abertos. O transporte de íons não teria valor para a célula se não houvesse meios para controlar o fluxo e se todos os muitos milhares de canais iônicos de uma membrana celular estivessem o tempo todo abertos. Em vez disso, os canais iônicos se abrem brevemente e então se fecham de novo (**Figura 12-21**). Como discutiremos, a maioria dos canais iônicos é *controlada*: um estímulo específico os aciona para que alternem entre um estado fechado e um estado aberto por uma mudança em sua conformação.

Como um canal iônico aberto não precisa sofrer mudanças conformacionais com cada íon que passa por ele, os canais iônicos têm uma grande vantagem em relação aos transportadores com respeito à sua taxa máxima de transporte. Mais de um milhão de íons podem passar por um canal aberto a cada segundo,

Figura 12-21 Um canal iônico típico oscila entre uma conformação fechada e uma aberta. O canal mostrado aqui em secção transversal forma um poro hidrofílico através da bicamada lipídica apenas na conformação "aberta". Os grupos polares revestem a parede do poro, ao passo que as cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos interagem com a bicamada lipídica (não mostrado). O poro se estreita em dimensões atômicas no filtro de seletividade, onde a seletividade iônica do canal é em grande parte determinada (ver Figura 12-20).

o que é uma taxa 1.000 vezes maior do que a taxa de transferência mais rápida conhecida para qualquer transportador. Por outro lado, os canais não podem acoplar o fluxo de íons a uma fonte de energia para realizar o transporte ativo. A função da maioria dos canais iônicos é apenas tornar a membrana transitoriamente permeável a íons inorgânicos selecionados, principalmente Na^+, K^+, Ca^{2+} ou Cl^-, permitindo que eles se difundam rapidamente a favor de seus gradientes eletroquímicos ao longo da membrana quando os portões do canal estão abertos.

Graças ao transporte ativo por bombas e outros transportadores, a maioria das concentrações iônicas está longe de um equilíbrio ao longo da membrana. Quando um canal se abre, consequentemente, os íons se lançam através dele. A impulsão dos íons significa um pulso de carga elétrica transferido para dentro da célula (quando os íons fluem para dentro) ou para fora da célula (quando os íons fluem para fora). O fluxo de íons muda a voltagem ao longo da membrana – o potencial de membrana –, alterando, assim, as forças motoras eletroquímicas dos movimentos transmembrânicos de todos os outros íons. Ele também força outros canais iônicos, os quais são especificamente sensíveis a mudanças no potencial de membrana, a abrir ou fechar em questão de milissegundos. O distúrbio de atividade elétrica resultante pode disseminar-se rapidamente de uma região à outra da membrana celular, transmitindo um sinal elétrico, como discutiremos no contexto das células nervosas. Esse tipo de sinalização elétrica não é restrito aos animais; ele também ocorre em protozoários e plantas. Plantas carnívoras, como a dioneia ou "papa-moscas" (*Dionaea muscipula*), por exemplo, usam a sinalização elétrica para detectar e aprisionar insetos (Figura 12-22).

Figura 12-22 **Uma dioneia usa a sinalização elétrica para capturar sua presa.** As folhas se fecham repentinamente em menos de meio segundo quando um inseto se move sobre elas. A resposta é desencadeada pelo toque em dois dos três pelos de disparo, dispostos em sequência no centro de cada folha. Esse estímulo mecânico abre canais iônicos e, assim, provoca um sinal elétrico, o qual, por um mecanismo desconhecido, leva a uma mudança rápida na pressão de turgor que fecha a folha. (Cortesia de J. S. Sira, Garden Picture Library.)

O potencial de membrana é a base de toda a atividade elétrica das células, sejam elas células vegetais, animais ou protozoárias. Contudo, antes de discutirmos como o potencial de membrana é gerado, veremos como a atividade dos canais iônicos é medida.

Os canais iônicos alternam entre estados aberto e fechado de modo repentino e aleatório

A medida de mudanças na corrente elétrica é o principal método usado para estudar os movimentos iônicos e os canais iônicos em células vivas. Surpreendentemente, as técnicas de registro elétrico têm sido refinadas ao ponto de que, hoje, é possível detectar e medir a corrente elétrica que flui através de uma única molécula do canal. O procedimento para isso é conhecido como **técnica de registro de *patch-clamp***, e ela fornece uma imagem direta e surpreendente de como os canais iônicos individuais se comportam.

Na técnica de registro de *patch-clamp*, um tubo fino de vidro é utilizado como um *microeletrodo* para isolar e fazer contato elétrico com uma pequena área da membrana na superfície da célula (Figura 12-23). A técnica torna possível registrar a atividade de canais iônicos em todos os tipos celulares – não só em células nervosas grandes, as quais são famosas por suas atividades elétricas, mas também em células de leveduras, por exemplo, que são demasiadamente pequenas para que seus eventos elétricos sejam detectados por outros métodos. Pela variação das concentrações de íons no meio em qualquer um dos dois lados do fragmento de membrana, podem testar-se quais íons atravessam seus canais residentes. Com o circuito eletrônico apropriado, a voltagem através do fragmento de membrana – ou seja, o potencial de membrana – também pode ser estabelecida e mantida fixa em qualquer valor escolhido (por isso o termo *patch-clamp*). A capacidade de expor a membrana a diferentes voltagens torna possível examinar como as mudanças no potencial de membrana afetam a abertura e o fechamento dos canais na membrana.

Com uma área suficientemente pequena de membrana no fragmento destacado, às vezes somente um único canal iônico estará presente. Os instrumentos elétricos modernos são suficientemente sensíveis para revelar o fluxo iônico através de um único canal, detectado como uma corrente elétrica muito pequena (na ordem de 10^{-12} amperes). Tipicamente, essas correntes se comportam de modo surpreendente: mesmo quando as condições são mantidas con-

Figura 12-23 A técnica de registro de *patch-clamp* é usada para monitorar a atividade dos canais iônicos. Primeiro, um microeletrodo é feito a partir do aquecimento de um tubo de vidro, que é puxado para criar uma ponta extremamente fina com um diâmetro de não mais do que alguns micrômetros; o tubo é, então, preenchido com uma solução condutora aquosa, e a ponta é pressionada contra a superfície celular. Com uma sucção suave, forma-se uma vedação elétrica firme onde a membrana celular faz contato com a boca do microeletrodo (A). Em virtude da vedação extremamente firme entre a boca do microeletrodo e a membrana, a corrente pode entrar ou sair do microeletrodo somente passando pelos canais no fragmento de membrana que cobre a ponta do microeletrodo. (B) Para expor a face citosólica da membrana, o fragmento de membrana aderido ao microeletrodo pode ser suavemente destacado da célula. A vantagem do fragmento destacado é que é fácil alterar a composição da solução em qualquer um dos dois lados da membrana para testar o efeito de vários solutos sobre o comportamento do canal. (C) Uma micrografia mostra uma célula nervosa do olho presa em uma pipeta de sucção (cuja ponta é mostrada à esquerda), ao passo que um microeletrodo está sendo usado para o registro de *patch-clamp*. (D) O sistema de circuitos para o registro de *patch-clamp*. Um fio metálico é inserido na extremidade aberta do microeletrodo. A corrente que entra no microeletrodo através dos canais iônicos no pequeno fragmento de membrana que cobre a ponta do microeletrodo passa pelo fio, através de instrumentos de medição, de volta ao recipiente com meio no qual a célula ou o fragmento destacado está situado (C, de T. D. Lamb, H. R. Mathews e V. Torre, *J. Physiol.* 37:315-349, 1986. Com permissão de Blackwell Publishing.)

stantes, as correntes se ligam e se desligam abruptamente, como se um interruptor de liga/desliga estivesse sendo acionado aleatoriamente (**Figura 12-24**). Esse comportamento sugere que o canal possui partes móveis e está alternando repentinamente de um lado a outro entre as conformações aberta e fechada (ver Figura 12-21). Como esse comportamento é visto mesmo quando as condições são constantes, ele presumivelmente indica que o canal está sendo levado de uma conformação à outra pelos movimentos térmicos aleatórios das moléculas em seu ambiente. O registro de um único canal é uma das poucas técnicas que podem ser usadas para monitorar as mudanças conformacionais de uma única molécula proteica. A imagem que surge é a de uma peça convulsiva de maquinaria sujeita a golpes constantes e violentos, o que também é certamente aplicável a outras proteínas com partes móveis.

Se os canais iônicos alternam entre as conformações aberta e fechada de modo repentino e aleatório mesmo quando as condições em cada lado da membrana são mantidas constantes, como seu estado pode ser regulado por condi-

Figura 12-24 O comportamento de um único canal iônico pode ser observado usando a técnica de *patch-clamp*. A voltagem (o potencial de membrana) através do fragmento de membrana isolado é mantida constante durante o registro. No exemplo, a membrana provém de uma célula muscular e contém uma única proteína canal que é responsiva ao neurotransmissor acetilcolina. Esse canal iônico se abre e permite a passagem de íons positivos quando a acetilcolina se liga à face exterior do canal, como é o caso aqui. Mesmo quando a acetilcolina está ligada ao canal, como é o caso durante as três explosões de abertura do canal mostradas aqui, o canal não permanece o tempo todo aberto. Em vez disso, o canal oscila entre os estados aberto e fechado, como observado nas breves quedas transitórias da corrente em cada uma das três explosões. Se a acetilcolina não estivesse ligada ao canal, o canal raramente se abriria. (Cortesia de David Colquhoun.)

ções do interior ou do exterior da célula? A resposta é que, quando as condições apropriadas mudam, o comportamento aleatório continua, mas com uma probabilidade muito modificada: se as condições alteradas tendem a abrir o canal, por exemplo, o canal agora passará uma proporção muito maior de seu tempo na conformação aberta, embora ele não permaneça aberto continuamente (ver Figura 12-24). Quando um canal iônico está aberto, ele está completamente aberto e, quando está fechado, ele está completamente fechado.

Diferentes tipos de estímulos influenciam a abertura e o fechamento dos canais iônicos

Há mais de cem tipos de canais iônicos, e mesmo organismos simples podem possuir muitos canais diferentes. O verme nematódeo *C. elegans*, por exemplo, possui genes que codificam 68 diferentes, ainda que relacionados, canais de K^+. Os canais iônicos diferem uns dos outros primariamente com respeito à sua *seletividade iônica* – o tipo de íons que eles permitem passar – e ao seu *controle* – as condições que influenciam a sua abertura e o seu fechamento. Para um **canal controlado por voltagem**, a probabilidade de ser aberto é controlada pelo potencial de membrana (**Figura 12-25A**). Para um **canal controlado por ligante**, a probabilidade de ser aberto é controlada pela ligação de alguma molécula (o ligante) ao canal (Figura 12-25B e C). Para um **canal controlado por estresse**, a abertura é controlada por uma força mecânica aplicada ao canal (Figura 12-25D). As *células do pelo auditivo* na orelha são um importante exemplo de células que dependem de canais com portões controlados por estresse. As vibrações sonoras fazem com que os canais se abram, causando o fluxo de íons para dentro das células do pelo; isso estabelece um sinal elétrico que é transmitido da célula do pelo até o nervo auditivo, o qual conduz o sinal ao cérebro (**Figura 12-26**).

Os canais iônicos controlados por voltagem respondem ao potencial de membrana

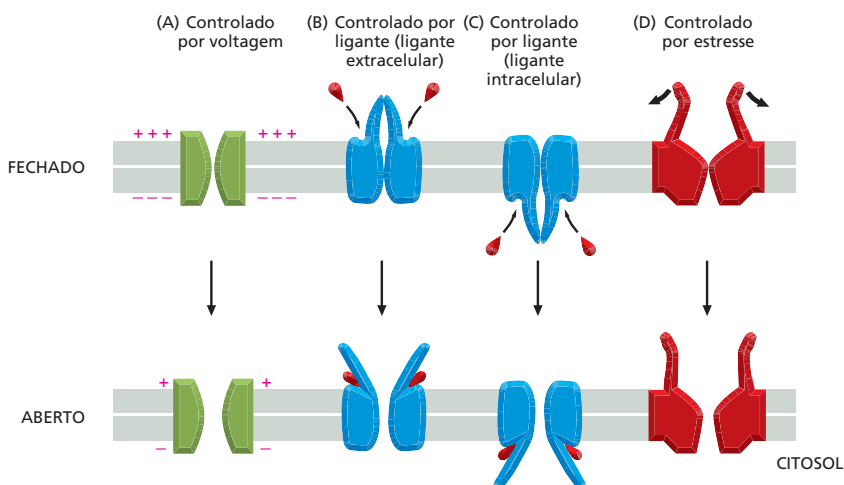
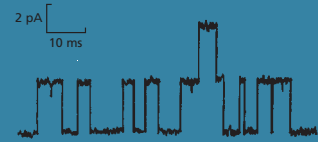
Os canais iônicos controlados por voltagem desempenham o papel principal na propagação dos sinais elétricos nas células nervosas. Eles também estão presentes em muitas outras células, incluindo células musculares, células-ovo, protozoários e até células vegetais, onde possibilitam que os sinais elétricos migrem de uma parte à outra da planta, como na resposta de fechamento foliar da mimosa (**Figura 12-27**). Os canais iônicos controlados por voltagem possuem domínios proteicos carregados especializados denominados *sensores de voltagem* que são extremamente sensíveis a mudanças no potencial de membrana: mudanças acima de um certo valor limiar exercem força elétrica suficiente nesses domínios

QUESTÃO 12-4

A Figura Q12-4 (acima) mostra o registro de um experimento de *patch-clamp* no qual a corrente elétrica que passa através de um fragmento de membrana é medida em função do tempo. O fragmento de membrana foi arrancado da membrana plasmática de uma célula muscular pela técnica mostrada na Figura 12-23 e contém moléculas do receptor de acetilcolina, o qual é um canal de cátion controlado por ligante que é aberto pela ligação de acetilcolina à face extracelular do canal. Para obter um registro, a acetilcolina foi adicionada à solução no microeletrodo. Descreva o que você pode deduzir sobre os canais a partir desse registro. Como o registro se diferenciaria se a acetilcolina fosse (i) omitida ou (ii) adicionada à solução somente do lado de fora do microeletrodo?

Figura 12-25 Os canais iônicos controlados respondem a diferentes tipos de estímulos. Dependendo do tipo de canal iônico, os portões se abrem em resposta a uma mudança na diferença de voltagem através da membrana (A), à ligação de um ligante químico à face extracelular (B) ou à face intracelular (C) de um canal ou ao estresse mecânico (D).

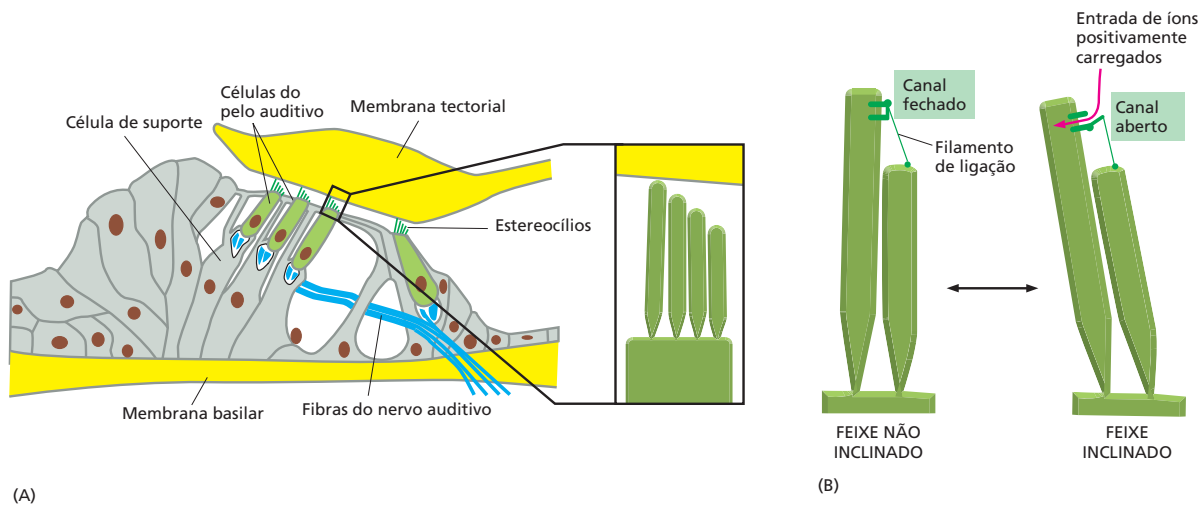
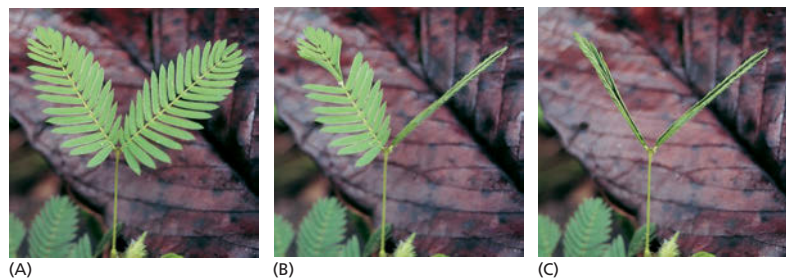



Figura 12-26 Os canais iônicos controlados por estresse nos permitem ouvir. (A) Uma secção através do órgão de Corti, o qual se estende por toda a cóclea, a porção auditiva da orelha. Cada célula do pelo auditivo possui um tufo de extensões pontudas, denominadas estereocílios, que se projetam de sua superfície superior. As células do pelo estão incrustadas em uma lâmina de células de suporte, a qual está encaixada entre a *membrana basilar* abaixo e a *membrana tectorial* acima. (Elas não são membranas da bicamada lipídica, mas sim lâminas de matriz extracelular.) (B) As vibrações sonoras fazem com que a membrana basilar vibre para cima e para baixo, causando a inclinação dos estereocílios. Cada estereocílio no arranjo escalonado em cada célula do pelo está ligado ao próximo estereocílio mais curto por um filamento fino. A inclinação distende os filamentos, os quais abrem os canais iônicos controlados por estresse na membrana do estereocílio, permitindo a entrada de íons positivamente carregados do líquido circundante (**Animação 12.6**). O influxo de íons ativa as células do pelo, as quais estimulam as terminações subjacentes das fibras do nervo auditivo que conduzem o sinal auditivo ao cérebro. O mecanismo das células do pelo é incrivelmente sensível: estima-se que a força necessária para abrir um único canal seja cerca de 2×10^{-13} newtons e que os sons mais fracos que podemos ouvir distendam os filamentos a uma média de cerca de 0,04 nm, o que é menos do que o diâmetro de um íon hidrogênio. A **Animação 12.7** mostra a flexibilidade notável dessas estruturas.

para estimular o canal a trocar de sua conformação fechada para a aberta, ou vice-versa. Uma mudança no potencial de membrana não afeta a amplitude de abertura do canal, mas altera a probabilidade de que ele seja encontrado em sua conformação aberta. Assim, em um fragmento grande de membrana, contendo muitas moléculas da proteína canal, pode-se verificar que, em média, 10% delas estão abertas em qualquer instante quando a membrana é mantida em um dado potencial, ao passo que 90% estão abertas quando a membrana é mantida em outro potencial.

Para avaliar a função dos canais iônicos controlados por voltagem em uma célula viva, temos de considerar o que controla o potencial de membrana. A resposta simples é que os próprios canais iônicos o controlam, e a abertura e o fechamento desses canais provocam sua mudança. Esse circuito fechado de controle, a partir de canais iônicos → potencial de membrana → canais iônicos, é fundamental a toda a sinalização elétrica nas células. Tendo visto como o potencial de membrana pode regular os canais iônicos, discutiremos agora como os canais iônicos podem controlar o potencial de membrana. Na última parte do capítulo, consideraremos como esse circuito fechado de controle funciona na propagação de sinais nas células nervosas.

Figura 12-27 Os canais iônicos controlados por voltagem formam a base da resposta de fechamento foliar na mimosa. (A) Folha em repouso. (B e C) Respostas sucessivas ao toque. Alguns segundos após a folha ser tocada, os folíolos se fecham repentinamente. A resposta envolve a abertura de canais iônicos controlados por voltagem, gerando um impulso elétrico. Quando o impulso alcança células de junção especializadas na base de cada folíolo, ocorre uma perda rápida de água por essas células, fazendo com que os folíolos se dobrem e se fechem súbita e progressivamente abaixo da haste foliar. (Cortesia de G. I. Bernard, com permissão de Oxford Scientific Films.)

O potencial de membrana é governado pela permeabilidade da membrana a íons específicos

Todas as células possuem uma diferença de potencial elétrico ou **potencial de membrana** ao longo de sua membrana plasmática. Para entender como esse potencial surge, é útil recordar alguns princípios básicos de eletricidade. Ao passo que a eletricidade em metais é conduzida por elétrons, a eletricidade em soluções aquosas é conduzida por íons, os quais são positivamente (cátions) ou negativamente (ânions) carregados. Um fluxo de íons através de uma membrana celular é detectável como uma corrente elétrica, e um acúmulo de íons, se não for balanceado na medida exata por um acúmulo de íons contrariamente carregados, é detectável como um acúmulo de carga elétrica ou um potencial de membrana (**Figura 12-28**).

Para compreender como o potencial de membrana é gerado e mantido, considere os movimentos de íons para dentro e para fora de uma célula animal típica em um estado "de repouso" não estimulado. As cargas negativas das moléculas orgânicas confinadas dentro da célula são em grande parte balanceadas por K^+, o íon positivo predominante no interior da célula. A alta concentração intracelular de K^+ é em parte gerada pela bomba de Na^+-K^+, a qual bombeia ativamente K^+ para dentro da célula. Isso leva a uma grande diferença de concentração de K^+ através da membrana plasmática, sendo a concentração de K^+ muito maior dentro da célula do que fora. Contudo, a membrana plasmática também contém um conjunto de canais de K^+ conhecidos como *canais de vazamento (ou canais de escape) de* K^+. Esses canais oscilam de forma aleatória entre os estados aberto e fechado, independentemente das condições presentes no interior ou no exterior celular e, quando estão abertos, permitem que o K^+ se mova livremente. Em uma célula em repouso, esses são os principais canais iônicos abertos na membrana plasmática, tornando, assim, a membrana plasmática em repouso muito mais permeável a K^+ do que a outros íons.

Portanto, o K^+ tem uma tendência a fluir para fora da célula através desses canais a favor de seu elevado gradiente de concentração. Contudo, qualquer transferência de carga positiva ao exterior deixa para trás cargas negativas desequilibradas dentro da célula, criando, desse modo, um campo elétrico ou potencial de membrana, o qual se contraporá a qualquer movimento adicional de K^+ para fora da célula. Dentro de mais ou menos um milissegundo, uma condição de equilíbrio é estabelecida, na qual o potencial de membrana é apenas suficientemente forte para contrabalançar a tendência do K^+ de mover-se a favor de seu gradiente de concentração – ou seja, no qual o gradiente eletroquímico de K^+ é zero, mesmo que ainda haja uma concentração muito maior de K^+ no interior celular do que no exterior (**Figura 12-29**).

O *potencial de repouso de membrana* é o potencial de membrana em tais condições de estado estacionário, nas quais o fluxo de íons positivos e negativos através da membrana plasmática é precisamente balanceado, de modo que dife-

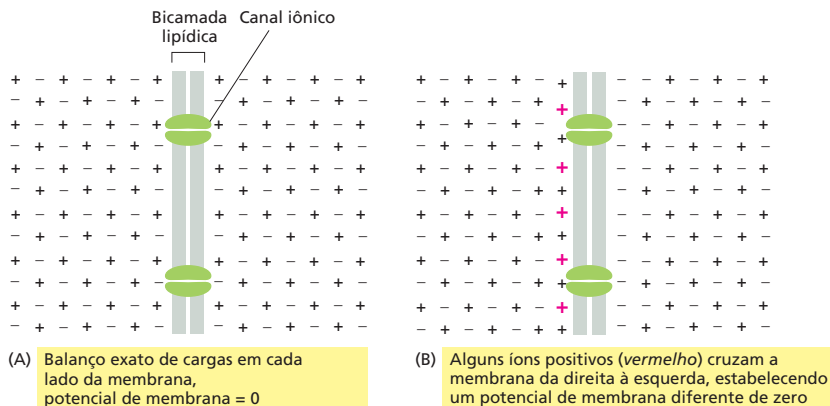



Figura 12-28 A distribuição de íons em qualquer um dos dois lados da bicamada lipídica dá origem ao potencial de membrana. O potencial de membrana resulta de uma camada fina (< 1 nm) de íons perto da membrana, mantida no lugar por sua atração elétrica a equivalentes contrariamente carregados no outro lado da membrana. (A) Quando há um balanço exato de cargas em ambos os lados da membrana, não há potencial de membrana. (B) Quando os íons de um tipo cruzam a membrana, eles estabelecem uma diferença de carga entre os dois lados da membrana que cria um potencial de membrana. O número de íons que deve mover-se através da membrana para estabelecer um potencial de membrana é uma fração muito pequena dos íons presentes. (6.000 íons K^+ cruzando 1 μm^2 de membrana celular são suficientes para alterar o potencial de membrana em cerca de 100 mV; o número de íons K^+ em 1 μm^3 de volume de citoplasma é 70.000 vezes maior do que isso.)

Figura 12-29 **Os canais de vazamento de K^+ desempenham um papel muito importante na geração do potencial de membrana através da membrana plasmática.** (A) Uma situação hipotética onde o canal de vazamento de K^+ está fechado e o potencial de membrana é zero. (B) Assim que o canal se abre, o K^+ tenderá a deixar a célula, movendo-se a favor de seu gradiente de concentração. Supondo que a membrana não contenha canais abertos permeáveis a outros íons, os íons K^+ atravessarão a membrana, mas os íons negativos serão incapazes de acompanhá-los. O resultado será um excesso de cargas positivas no exterior da membrana e de cargas negativas no interior. Isso dá origem a um potencial de membrana que tende a direcionar o K^+ de volta para dentro. Em equilíbrio, o efeito do gradiente de concentração de K^+ é exatamente balanceado pelo efeito do potencial de membrana, e não há movimento líquido de K^+.

ESPAÇO EXTRACELULAR

CITOSOL

K^+

Força motora gerada pelo gradiente de concentração de K^+

Força motora gerada pelo gradiente de voltagem

(A) Canal de K^+ fechado, potencial de membrana = 0; mais K^+ dentro da célula do que fora, mas carga líquida zero em cada lado (as cargas positivas e negativas se balanceiam exatamente)

(B) Canal de K^+ aberto; o K^+ se move para fora, deixando os íons negativos para trás, e essa distribuição de carga cria um potencial de membrana que balanceia a tendência do K^+ de mover-se para fora

renças adicionais na carga não se acumulem através da membrana. O potencial de membrana é medido como uma diferença de voltagem através da membrana. Em células animais, o potencial de repouso de membrana varia entre –20 e –200 milivolts (mV), dependendo do organismo e do tipo celular. Ele é expresso como um valor negativo porque o interior da célula é negativo em relação ao exterior, uma vez que as cargas negativas no interior celular excedem levemente as cargas positivas. O valor real do potencial de membrana de repouso em células animais é principalmente um reflexo do gradiente de concentração de K^+ através da membrana plasmática, pois, em repouso, essa membrana é principalmente permeável a K^+, e o K^+ é o principal íon positivo dentro da célula. Uma fórmula simples, denominada **equação de Nernst** (Figura 12-30), expressa o equilíbrio quantitativamente e torna possível calcular o potencial de membrana de repouso teórico se a proporção da concentração de íons interna em relação à externa for conhecida.

Agora, suponha que outros canais permeáveis a algum outro íon – como o Na^+ – sejam subitamente abertos na membrana plasmática. Como o Na^+ está a uma concentração mais alta no exterior celular do que no interior, o Na^+ se deslocará para dentro da célula através desses canais, e o potencial de membrana ficará menos negativo, talvez até invertendo o sinal e se tornando positivo (de modo que o interior da célula seja positivo em relação ao exterior). O potencial de membrana será alterado para um novo valor que é um meio-termo entre o valor negativo, que corresponderia ao equilíbrio para K^+, e o valor positivo, que corresponderia ao equilíbrio para Na^+. Assim, qualquer mudança na permeabilidade da membrana a íons específicos – ou seja, qualquer mudança nos números de canais iônicos de diferentes tipos que estão abertos – causa uma mudança no potencial de membrana. O potencial de membrana, portanto, é determinado tanto pelo estado dos canais iônicos na membrana como pelas concentrações iônicas nos meios citosólico e extracelular. Como os processos elétricos na membrana plasmática ocorrem muito rapidamente em comparação com as mudanças no volume das concentrações iônicas, em curto prazo – milissegundos em comparação com segundos ou minutos –, os canais iônicos são mais importantes no controle do potencial de membrana.

Para examinar como a relação entre o potencial de membrana e os canais iônicos é usada para a sinalização elétrica, passaremos agora do comportamento dos íons e canais iônicos para o comportamento de células inteiras. Tomaremos as células nervosas como nosso exemplo primário, pois elas, mais do que qualquer outro tipo celular, se especializaram nos mecanismos de sinalização elétrica e empregam os canais iônicos de modo muito sofisticado.

A força que tende a direcionar um íon através de uma membrana é constituída por dois componentes: um devido ao potencial elétrico da membrana e um devido ao gradiente de concentração do íon. Em equilíbrio, as duas forças estão balanceadas e satisfazem uma relação matemática simples dada pela

equação de Nernst

$$V = 62 \log_{10} (C_o/C_i)$$

onde V é o potencial de membrana em milivolts e C_o e C_i são as concentrações do íon no exterior e no interior, respectivamente. Essa forma da equação supõe que o íon carrega uma única carga positiva e que a temperatura é 37 °C.

Figura 12-30 A equação de Nernst pode ser usada para calcular o potencial de repouso de uma membrana.

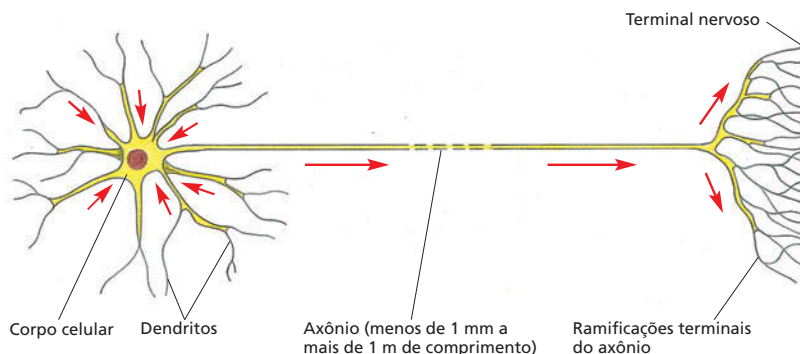
OS CANAIS IÔNICOS E A SINALIZAÇÃO EM CÉLULAS NERVOSAS

A tarefa fundamental de uma célula nervosa, ou **neurônio**, é receber, conduzir e transmitir sinais. Os neurônios carregam sinais para dentro dos órgãos dos sentidos até o sistema nervoso central – o cérebro e a medula espinal. No sistema nervoso central, os neurônios transmitem sinais uns aos outros através de redes de enorme complexidade, permitindo ao cérebro e à medula espinal analisar, interpretar e responder aos sinais que chegam dos órgãos dos sentidos. A partir do sistema nervoso central, os neurônios estendem processos para fora, a fim de transmitir sinais necessários à ação de músculos e glândulas. Para realizar essas funções, os neurônios são, com frequência, extremamente alongados: os neurônios motores humanos que carregam sinais da medula espinal a um músculo do pé, por exemplo, podem ter um metro de comprimento.

Todos os neurônios consistem em um *corpo celular* (contendo o núcleo) que possui várias extensões longas e finas que se irradiam a partir dele. Normalmente, um neurônio possui um longo **axônio**, o qual conduz sinais do corpo celular para células-alvo distantes; ele também normalmente possui vários *dendritos* mais curtos e ramificados, os quais se estendem a partir do corpo celular como antenas e propiciam uma área superficial aumentada para a recepção de sinais dos axônios de outros neurônios (Figura 12-31). Em sua extremidade, o axônio geralmente se divide em muitas ramificações, cada qual acabando em um **terminal nervoso**, de modo que a mensagem de um neurônio pode ser simultaneamente passada a muitas células-alvo – tanto outros neurônios como células musculares ou glandulares. Da mesma forma, as ramificações dos dendritos podem ser extensas e, em alguns casos, suficientes para receber até 100.000 entradas de informação em um único neurônio.

Independentemente do significado do sinal que um neurônio carrega – informação visual proveniente do olho, um comando motor para um músculo ou uma etapa em uma rede complexa de processamento neural no cérebro –, a forma do sinal sempre é a mesma: ela consiste em mudanças no potencial elétrico através da membrana plasmática do neurônio.

Os potenciais de ação propiciam a comunicação rápida à longa distância

Um neurônio é estimulado por um sinal – tipicamente proveniente de outro neurônio – transferido a um sítio localizado em sua superfície. Esse sinal inicia uma mudança no potencial de membrana naquele sítio. Para transmitir o sinal adiante, entretanto, a mudança no potencial de membrana tem de propagar-se a partir desse ponto, o qual é normalmente em um dendrito ou no corpo celular, até os terminais do axônio, que retransmitem o sinal para as próximas células da rota. Embora uma mudança local no potencial de membrana se propague passivamente ao longo de um axônio ou um dendrito para regiões adjacentes da membrana plasmática, ela rapidamente se torna mais fraca à medida que

QUESTÃO 12-5

A partir das concentrações dadas na Tabela 12-1 (p. 388), calcule o potencial de membrana de equilíbrio de K^+ e Na^+ (suponha que a concentração de Na^+ intracelular seja 10 mM). Que potencial de membrana você esperaria em uma célula em repouso? Explique sua resposta. O que aconteceria se um grande número de canais de Na^+ se abrisse subitamente, tornando a membrana muito mais permeável a Na^+ do que a K^+? (Note que, como poucos íons precisam mover-se através da membrana para mudar a distribuição de cargas ao longo da membrana drasticamente, você pode supor que as concentrações iônicas em qualquer um dois lados da membrana não se alteram significativamente.) Se os canais de Na^+ se fechassem novamente, o que você esperaria que acontecesse depois?

Figura 12-31 Um neurônio típico possui um corpo celular, um único axônio e dendritos múltiplos. O axônio conduz sinais a partir do corpo celular para suas células-alvo, ao passo que os dendritos múltiplos recebem sinais provenientes dos axônios de outros neurônios. A seta *vermelha* indica a direção na qual os sinais são transmitidos.

Figura 12-32 **A lula *Loligo* possui um sistema nervoso organizado para permitir que o animal responda rapidamente a ameaças em seu ambiente.** Entre as células nervosas que compõem esse sistema de escape está uma que possui um "axônio gigante", o qual é muito grande em diâmetro. Muito antes de a técnica de *patch-clamp* permitir o registro de canais individuais em células pequenas, os cientistas foram capazes de registrar os potenciais de ação no axônio gigante da lula e deduzir a existência de canais iônicos em sua membrana. (Cortesia de Howard Hall, com permissão de Oxford Scientific Films.)

aumenta a distância da fonte. Em distâncias curtas, esse enfraquecimento não é importante. No entanto, na comunicação à longa distância, tal *propagação passiva* é inadequada. Da mesma forma, um sinal telefônico pode ser transmitido sem amplificação por distâncias curtas através das linhas telefônicas dentro de sua cidade; mas, para transmissões que cruzam o oceano por cabos submarinos, a força do sinal tem de ser impulsionada a intervalos.

Os neurônios resolvem esse problema de comunicação à longa distância pelo emprego de um mecanismo ativo de sinalização: um estímulo elétrico local de força suficiente desencadeia uma explosão de atividade elétrica na membrana plasmática que é propagada rapidamente ao longo da membrana do axônio e sustentada por renovação automática durante toda a via. Essa onda itinerante de excitação elétrica, conhecida como **potencial de ação** ou *impulso nervoso*, pode carregar uma mensagem, sem o enfraquecimento do sinal, de uma extremidade de um neurônio a outra a velocidades que chegam a 100 metros por segundo.

Todas as pesquisas iniciais que estabeleceram o mecanismo de sinalização elétrica ao longo dos axônios dos nervos foram realizadas com o axônio gigante da lula (Figura 12-32). Esse axônio possui um diâmetro tão grande que é possível registrar sua atividade elétrica a partir de um eletrodo inserido diretamente nele (Como Sabemos, p. 412-413). A partir desses estudos, deduziu-se que os potenciais de ação são uma consequência direta das propriedades de canais iônicos controlados por voltagem (ver Figura 12-25A) na membrana da célula nervosa, como explicaremos a seguir.

Os potenciais de ação são normalmente mediados por canais de Na^+ controlados por voltagem

Um potencial de ação em um neurônio é tipicamente desencadeado por uma súbita *despolarização* local da membrana plasmática – ou seja, por uma alteração no potencial de membrana para um valor menos negativo (ou seja, uma alteração em direção a zero). Discutiremos como tal despolarização é causada pela ação de moléculas sinalizadoras – *neurotransmissores* – liberadas por outro neurônio. Um estímulo que causa uma despolarização suficientemente grande, a ponto de ultrapassar um certo valor limiar, causa prontamente a abertura temporária dos **canais de Na^+ controlados por voltagem** naquele local, permitindo que uma pequena quantidade de Na^+ entre na célula a favor de seu gradiente eletroquímico. O influxo de carga positiva despolariza ainda mais a membrana (ou seja, torna o potencial de membrana menos negativo), abrindo, desse modo, mais canais de Na^+ controlados por voltagem, os quais admitem mais íons Na^+ e ocasionam uma despolarização ainda maior. Esse processo continua de forma autoamplificadora até que, dentro de cerca de um milissegundo, o potencial de membrana na região local da membrana tenha alterado seu valor de repouso de cerca de –60 mV para cerca de +40 mV (Figura 12-33). Essa voltagem é próxima do potencial de membrana no qual a força motora eletroquímica para o movimento de Na^+ através da membrana é zero – ou seja, no qual os efeitos do potencial de membrana e do

Figura 12-33 **Um potencial de ação é desencadeado por uma mudança rápida no potencial de membrana.** O potencial de membrana de repouso desse neurônio é –60 mV. O potencial de ação é desencadeado quando um estímulo despolariza a membrana plasmática por cerca de 20 mV, tornando o potencial de membrana –40 mV, o qual é o valor limiar nesta célula para o início de um potencial de ação. Uma vez que um potencial de ação é desencadeado, a membrana se despolariza rapidamente: o potencial de membrana (curva *vermelha*) oscila ao passar de zero e alcança +40 mV antes de retornar ao seu valor negativo de repouso, quando o potencial de ação termina. A curva *verde* mostra como o potencial de membrana teria simplesmente diminuído de volta ao valor de repouso após o estímulo inicial de despolarização, se não houvesse canais iônicos controlados por voltagem na membrana plasmática.

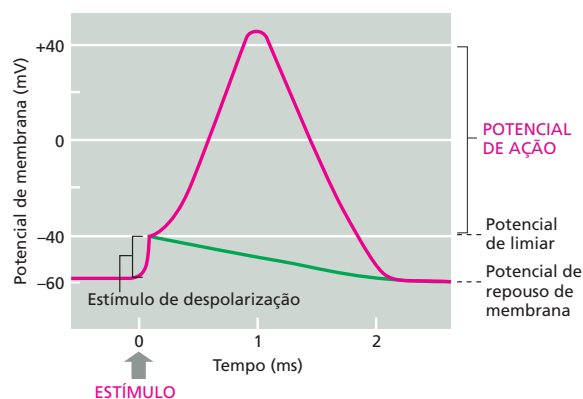
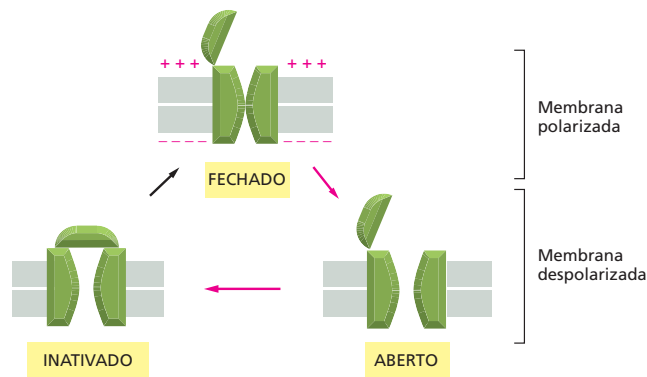



Figura 12-34 Um canal de Na^+ controlado por voltagem pode adotar pelo menos três conformações. O canal pode oscilar de uma conformação a outra, dependendo do potencial de membrana. Quando a membrana está em repouso (altamente polarizada), a conformação fechada é a mais estável. Contudo, quando a membrana é despolarizada, a conformação aberta é a mais estável, e, então, o canal tem uma alta probabilidade de se abrir; porém, na membrana despolarizada, a conformação inativada ainda é mais estável, e, então, após um período breve na conformação aberta, o canal se torna inativado e não pode abrir-se. As setas *vermelhas* indicam a sequência que se segue a uma despolarização súbita, e as setas *pretas* indicam o retorno à conformação original após a repolarização da membrana.

gradiente de concentração para Na^+ são iguais e opostos e o Na^+ não tende mais a entrar ou sair da célula. Se os canais continuassem a responder indefinidamente desse modo ao potencial de membrana alterado, a célula emperraria nesse exato ponto com todos os seus canais de Na^+ controlados por voltagem predominantemente abertos.

A célula é poupada desse destino porque os canais de Na^+ possuem um mecanismo automático de inativação, o qual faz com que eles adotem rapidamente (dentro de mais ou menos um milissegundo) uma conformação inativa especial, na qual o canal não é capaz de se abrir novamente. Mesmo que a membrana ainda esteja despolarizada, os canais de Na^+ permanecerão nesse *estado inativado* até alguns milissegundos após o potencial de membrana retornar ao seu valor negativo inicial. Uma ilustração esquemática desses três estados distintos do canal de Na^+ controlado por voltagem – *fechado*, *aberto* e *inativado* – é apresentada na **Figura 12-34**. A **Figura 12-35** mostra como eles contribuem para o aumento e a queda do potencial de ação.

A membrana também é auxiliada a retornar ao seu valor de repouso pela abertura de *canais de K^+ controlados por voltagem*. Esses canais também se abrem em resposta à despolarização da membrana, mas não tão prontamente como os canais de Na^+, e ficam abertos contanto que a membrana permaneça despolarizada. Consequentemente, quando o potencial de ação alcança seu pico, os íons K^+ (carregando carga positiva) começam a fluir para fora da célula através desses canais de K^+ a favor de seu gradiente eletroquímico, estando temporariamente desimpedidos pelo potencial de membrana negativo que os retêm na célula em repouso. O fluxo rápido de K^+ através dos canais de K^+ controlados por voltagem traz a membrana de volta ao estado de repouso mais rapidamente

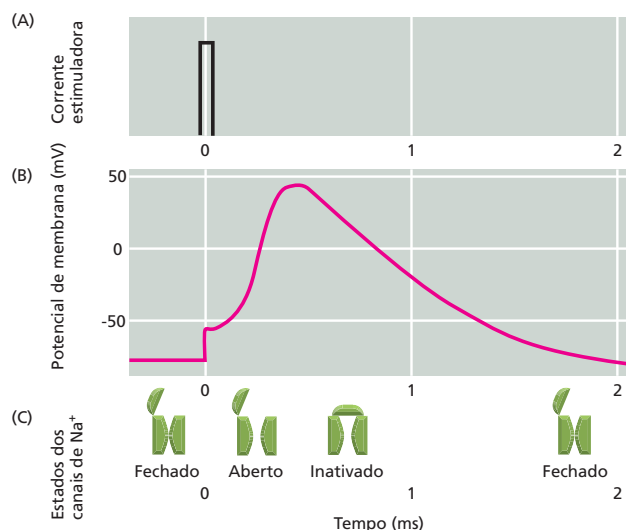



Figura 12-35 Os fluxos iônicos ditam o aumento e a queda de um potencial de membrana. Nesse exemplo, o potencial de ação é desencadeado por um pulso breve de corrente elétrica (A), o qual despolariza parcialmente a membrana, como mostrado no gráfico do potencial de membrana contra o tempo (B). (B) mostra o curso do potencial de ação (curva *vermelha*) que é causado pela abertura e subsequente inativação dos canais de Na^+ controlados por voltagem, cujo estado é mostrado em (C). Ainda que reestimulada, a membrana não pode produzir um segundo potencial de ação até que os canais de Na^+ tenham retornado da conformação inativada à completamente fechada (ver Figura 12-34). Até então, a membrana é resistente, ou refratária, à estimulação.

COMO SABEMOS:

A LULA REVELA OS SEGREDOS DA EXCITABILIDADE DA MEMBRANA

A cada primavera, a espécie *Loligo pealei* migra para as águas rasas próximas a Cape Cod, na costa leste dos Estados Unidos. Lá, ela desova, lançando a próxima geração de lulas. Contudo, esses animais fazem mais do que apenas se reunir e se reproduzir: eles proporcionam aos neurocientistas que se reúnem no Laboratório de Biologia Marinha, em Woods Hole, Massachusetts, um excelente sistema para o estudo dos mecanismos de sinalização elétrica ao longo dos axônios dos nervos.

Como a maioria dos animais, a lula sobrevive capturando presas e escapando de predadores. Reflexos rápidos e uma capacidade de acelerar rapidamente e fazer mudanças súbitas na direção de natação ajudam o animal a evitar o perigo enquanto está perseguindo uma refeição decente. As lulas obtêm sua velocidade e agilidade de um sistema biológico especializado de propulsão a jato: elas puxam água para dentro de sua cavidade do manto e então contraem sua parede corporal muscular, a fim de expelir rapidamente a água coletada através de um sifão tubular, propelindo-se, desse modo, pela água.

O controle dessa contração muscular tão rápida e coordenada requer um sistema nervoso capaz de transmitir sinais com grande velocidade ao longo da extensão do corpo do animal. De fato, a espécie *Loligo pealei* possui algumas das maiores fibras nervosas encontradas na natureza. Os axônios gigantes da lula podem alcançar 10 cm de comprimento e têm mais de 100 vezes o diâmetro de um axônio de mamífero – aproximadamente a largura de um grafite de lápis. Em termos gerais, quanto maior o diâmetro de um axônio, mais rapidamente os sinais podem migrar ao longo de sua extensão.

Na década de 1930, os cientistas começaram a tirar proveito do axônio gigante da lula para estudar a eletrofisiologia da célula nervosa. Em virtude do seu tamanho relativamente grande, os pesquisadores podem inserir eletrodos no axônio para medir sua atividade elétrica e monitorar seus potenciais de ação. Esse sistema experimental permitiu aos pesquisadores abordar uma série de questões sobre a condutância da membrana nos neurônios, incluindo quais íons são importantes à iniciação e propagação de um potencial de ação, como a permeabilidade da membrana muda com a passagem de um potencial de ação e como essas mudanças no potencial de membrana controlam a abertura e o fechamento dos canais iônicos.

Estrutura de ação

Como o axônio da lula é tão longo e largo, um eletrodo feito de um tubo capilar de vidro contendo uma solução condutora pode ser inserido ao longo do eixo do axônio, de modo que sua extremidade fique situada no citoplasma (**Figura 12-36A**). Esse arranjo, então, permite que a diferença de voltagem entre o interior e o exterior do axônio – ou seja, o potencial de membrana – seja medida quando um potencial de ação passa pela extremidade do eletrodo (Figura 12-36B). O potencial de ação em si é desencadeado pela aplicação de um breve estímulo elétrico a uma extremidade do axônio. É indiferente qual extremidade é estimulada, uma vez que a excitação pode propagar-se para ambas as direções; a intensidade do estímulo também é indiferente, contanto que ela exceda um certo limiar: um potencial de ação é tudo ou nada.

Assim que os pesquisadores puderam gerar e medir um potencial de ação de modo confiável, eles usaram o sistema do axônio da lula para responder a outras questões sobre a excitabilidade da membrana. Por exemplo, quais íons são fundamentais a um potencial de ação? Os três íons mais abundantes, tanto no interior como no exterior do axônio, são Na^+, K^+ e Cl^-. Eles têm importância igual no que se refere ao potencial de ação? Como o axônio da lula é tão grande e robusto, é possível expelir o citoplasma do axônio como a pasta de dente de um tubo (**Figura 12-37A**). O axônio pode, então, ser preenchido internamente com uma solução pura de Na^+, K^+, Cl^- ou SO_4^{2-} (Figura 12-37B); os íons na solução de banho po-

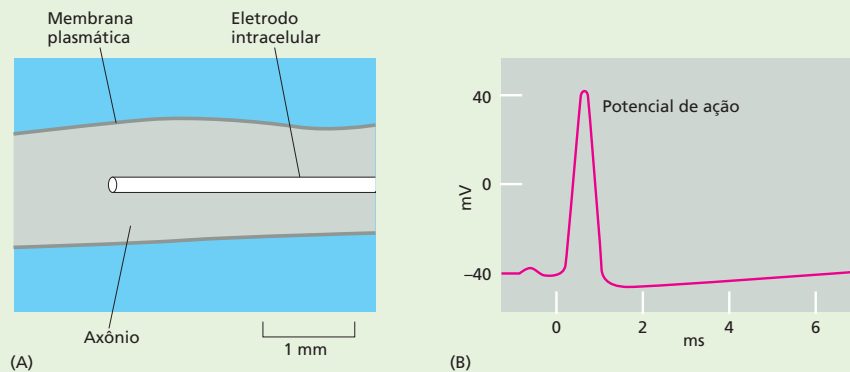



Figura 12-36 Um eletrodo pode ser inserido no axônio gigante da lula (A) para medir os potenciais de membrana (B).

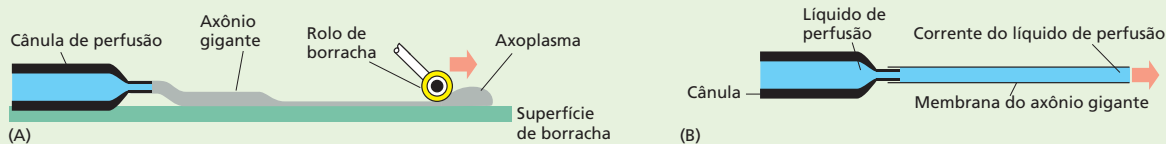



Figura 12-37 **O citoplasma de um axônio pode ser removido e substituído por uma solução artificial de íons puros.** (A) O citoplasma do axônio é expelido usando um rolo de borracha. (B) Um líquido de perfusão contendo a concentração desejada de íons é bombeado suavemente através do axônio.

dem ser independentemente variados. Notavelmente, os pesquisadores que estavam realizando esse experimento descobriram que o axônio gerará um potencial de ação normal se e somente se as concentrações de Na^+ e K^+ se aproximarem das concentrações naturais encontradas dentro e fora da célula. Assim, os componentes celulares cruciais ao potencial de ação são a membrana plasmática, os íons Na^+ e K^+ e a energia propiciada pelos gradientes de concentração desses íons através da membrana; todos os outros componentes, incluindo outras fontes de energia metabólica, foram presumivelmente removidos pela perfusão.

Tráfego de canal

Uma vez que o Na^+ e o K^+ foram considerados fundamentais a um potencial de ação, surge então a seguinte questão: qual a contribuição de cada um desses íons ao potencial de ação? Quão permeável é a membrana a cada um deles e como a permeabilidade da membrana se altera com a passagem de um potencial de ação? Novamente, o axônio gigante da lula forneceu algumas respostas. As concentrações de Na^+ e K^+ no exterior da membrana podiam ser alteradas, e os efeitos dessas mudanças no potencial de membrana podiam ser diretamente medidos. A partir desses estudos, determinou-se que, em repouso, o potencial de membrana de um axônio é próximo ao potencial de equilíbrio para K^+. Quando a concentração externa de K^+ é variada, o potencial de repouso do axônio muda aproximadamente de acordo com a equação de Nernst (ver Figura 12-30). Em repouso, portanto, a membrana é principalmente permeável a K^+; como sabemos, os canais de vazamento de K^+ constituem a principal rota usada por esses íons através da membrana celular.

A situação do Na^+ é muito diferente. Quando a concentração externa de Na^+ é variada, não há efeito sobre o potencial de repouso do axônio. Contudo, a altura do pico do potencial de ação varia com a concentração de Na^+ no exterior da membrana (**Figura 12-38**). Durante o potencial de ação, portanto, a membrana parece ser principalmente permeável a Na^+, em consequência da abertura dos canais de Na^+. Em virtude do potencial de ação, os canais de sódio se fecham, e o potencial de membrana retorna a um valor negativo que depende da concentração externa de K^+. No momento em que a membrana perde sua permeabilidade ao Na^+, ela se torna ainda mais permeável ao K^+ do que antes. A abertura de canais de K^+ adicionais ajuda a acelerar esse restabelecimento do potencial de membrana ao estado de repouso. Isso deixa a membrana preparada para o próximo potencial de ação.

Esses estudos com o axônio gigante da lula deram uma enorme contribuição ao nosso entendimento da excitabilidade neuronal, e os pesquisadores que estabeleceram o sistema e fizeram as descobertas revisadas aqui receberam o Prêmio Nobel de 1963.

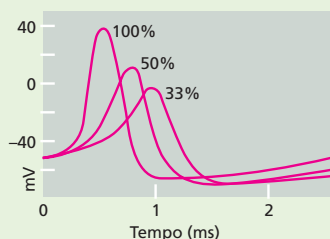



Figura 12-38 **O formato do potencial de ação depende da concentração de Na^+ do lado de fora da membrana.** Aqui são mostrados os potenciais de ação registrados quando o meio externo contém 100, 50 ou 33% da concentração normal de Na^+.

QUESTÃO 12-6

Explique, em não mais do que 100 palavras, como um potencial de ação é passado ao longo de um axônio.

do que poderia ser atingido pelo fluxo de K^+ através dos canais de vazamento de K^+ isoladamente.

Tal descrição de um potencial de ação se refere apenas a um pequeno fragmento da membrana plasmática. A despolarização autoamplificadora do fragmento, contudo, é suficiente para despolarizar regiões vizinhas da membrana, as quais então passam pelo mesmo ciclo de autoamplificação. Desse modo, o potencial de ação se propaga externamente como uma onda itinerante a partir do ponto inicial de despolarização, alcançando, finalmente, as extremidades do axônio (**Figura 12-39**). Defrontadas com as consequências dos fluxos de Na^+ e K^+ causados pela passagem de um potencial de ação, as moléculas locais da ATPase de Na^+-K^+ trabalham continuamente, a fim de restaurar os gradientes iônicos através da membrana plasmática do axônio.

Figura 12-39 Um potencial de ação pode ser propagado ao longo da extensão de um axônio. (A) Esta figura esquemática mostra as voltagens (V_1, V_2 e V_3) que seriam registradas a partir de um conjunto de eletrodos intracelulares dispostos em intervalos ao longo do axônio, cuja largura está muito exagerada aqui. Note que o potencial de ação não enfraquece à medida que se propaga. O estímulo ativador é administrado no tempo $t = 0$, e a direção na qual o potencial de ação está se propagando é indicada pela seta *vermelha*. (B) As mudanças nos canais de Na^+ e os consequentes fluxos de corrente elétrica através da membrana (setas *laranjas*) perturbam o potencial de membrana e dão origem ao potencial de ação itinerante, como mostrado aqui e na **Animação 12.8**. A região do axônio com a membrana despolarizada está sombreada em *azul*. Note que um potencial de ação só pode propagar-se para frente a partir do local de despolarização, porque a inativação dos canais de Na^+ impede a despolarização de expandir-se para trás (ver também Figura 12-35).

Figura 12-40 Os neurônios transmitem sinais químicos por meio das sinapses. Uma micrografia eletrônica (A) e um desenho (B) de uma secção transversal de dois terminais nervosos (*amarelo*) formando sinapses em um único dendrito de célula nervosa (*azul*) no cérebro de um mamífero. Note que as membranas pré-sinápticas e pós-sinápticas são espessadas na sinapse. (A, cortesia de Cedric Raine.)

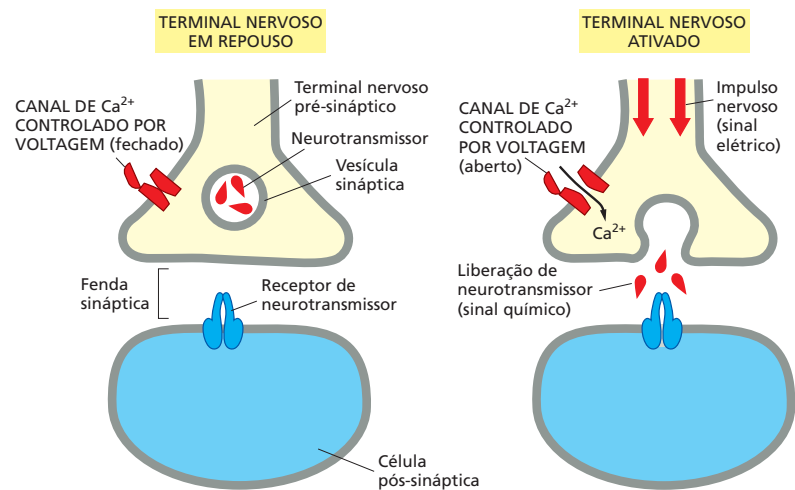
Os canais de Ca^{2+} controlados por voltagem convertem sinais elétricos em sinais químicos nos terminais nervosos

Quando um potencial de ação alcança os *terminais nervosos* na extremidade de um axônio, o sinal deve, de algum modo, ser retransmitido às *células-alvo* com as quais os terminais nervosos fazem contato: em geral, neurônios ou células musculares. O sinal é transmitido às células-alvo em junções especializadas conhecidas como **sinapses**. Na maioria das sinapses, as membranas plasmáticas das células transmissoras e receptoras – as células *pré-sinápticas* e *pós-sinápticas*, respectivamente – são separadas umas das outras por uma estreita *fenda sináptica* (tipicamente com 20 nm de largura), a qual não pode ser atravessada pelo sinal elétrico (**Figura 12-40**). Para a mensagem ser transmitida de um neurônio ao outro, o sinal elétrico é convertido em um sinal químico, na forma de uma pequena molécula sinalizadora conhecida como **neurotransmissor**.

Os neurotransmissores são armazenados já prontos nos terminais nervosos, empacotados em **vesículas sinápticas** envolvidas por membrana (ver Figura 12-40). Quando o potencial de ação alcança o terminal, os neurotransmissores são liberados a partir da terminação nervosa por exocitose (discutido no Capítulo 15). O elo entre o potencial de ação e a secreção envolve a ativação de outro tipo de canal de cátion controlado por voltagem. A despolarização da membrana plasmática do terminal nervoso, causada pela chegada do potencial de ação, abre transitoriamente os *canais de Ca^{2+} controlados por voltagem*, os quais se concentram na membrana plasmática do terminal nervoso pré-sináptico. Como a concentração de Ca^{2+} no exterior da célula é mais de 1.000 vezes mais elevada do que a concentração de Ca^{2+} livre no citosol, o Ca^{2+} penetra rapidamente no terminal nervoso através dos canais abertos. O aumento resultante da concentração de Ca^{2+} no citosol da célula pré-sináptica desencadeia a fusão de algumas das vesículas sinápticas com a membrana plasmática, liberando o neurotransmissor na fenda sináptica. Graças aos canais de Ca^{2+} controlados por voltagem, o sinal elétrico pode ser, agora, convertido em um sinal químico (**Figura 12-41**).

Os canais controlados por transmissor nas células-alvo convertem sinais químicos novamente em sinais elétricos

O neurotransmissor liberado se difunde rapidamente através da fenda sináptica e se liga aos *receptores do neurotransmissor* concentrados na membrana

Figura 12-41 Um sinal elétrico é convertido em um sinal químico em um terminal nervoso. Quando um potencial de ação alcança um terminal nervoso, ele abre canais de Ca^{2+} controlados por voltagem na membrana plasmática, permitindo o fluxo de Ca^{2+} para dentro do terminal. O aumento de Ca^{2+} no terminal nervoso estimula a fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática, liberando seu neurotransmissor na fenda sináptica.

pós-sináptica da célula-alvo. A ligação do neurotransmissor aos seus receptores causa uma mudança no potencial de membrana da célula-alvo, o que pode fazer com que a célula acione um potencial de ação. O neurotransmissor é, então, removido rapidamente da fenda sináptica – quer por enzimas que o destroem, quer pela recaptura nos terminais nervosos que o liberaram, ou em células vizinhas. Essa remoção rápida do neurotransmissor limita o sinal e assegura que, quando a célula pré-sináptica não é excitada, a célula pós-sináptica também não será excitada.

Os receptores de neurotransmissores podem ser de vários tipos; alguns medeiam efeitos relativamente lentos na célula-alvo, ao passo que outros desencadeiam respostas mais rápidas. As respostas rápidas – em uma escala de tempo de milissegundos – dependem de receptores que são *canais iônicos controlados por transmissor* (também denominados receptores acoplados a canais iônicos). Esses canais constituem uma subclasse dos canais iônicos controlados por ligante (ver Figura 12-25B), e sua função é converter o sinal químico carregado por um neurotransmissor novamente em um sinal elétrico. Os canais se abrem transitoriamente em resposta à ligação do neurotransmissor, alterando, assim, a permeabilidade iônica da membrana pós-sináptica. Isso, por sua vez, causa uma mudança no potencial de membrana (**Figura 12-42**); se a mudança for suficientemente grande, ela pode desencadear um potencial de ação na célula pós-sináptica. Um exemplo bem estudado de canal iônico com portões controlados por transmissor é encontrado na *junção neuromuscular* – o tipo especializado

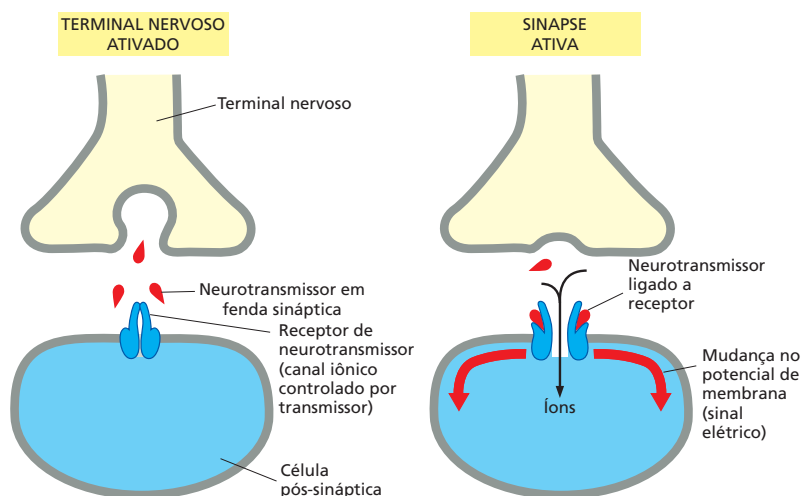



Figura 12-42 Um sinal químico é convertido em um sinal elétrico por canais iônicos controlados por transmissor em uma sinapse. O neurotransmissor liberado se liga e abre os canais iônicos controlados por transmissor na membrana plasmática da célula pós-sináptica. O fluxo iônico resultante altera o potencial de membrana da célula pós-sináptica, convertendo, assim, o sinal químico novamente em um sinal elétrico (**Animação 12.9**).

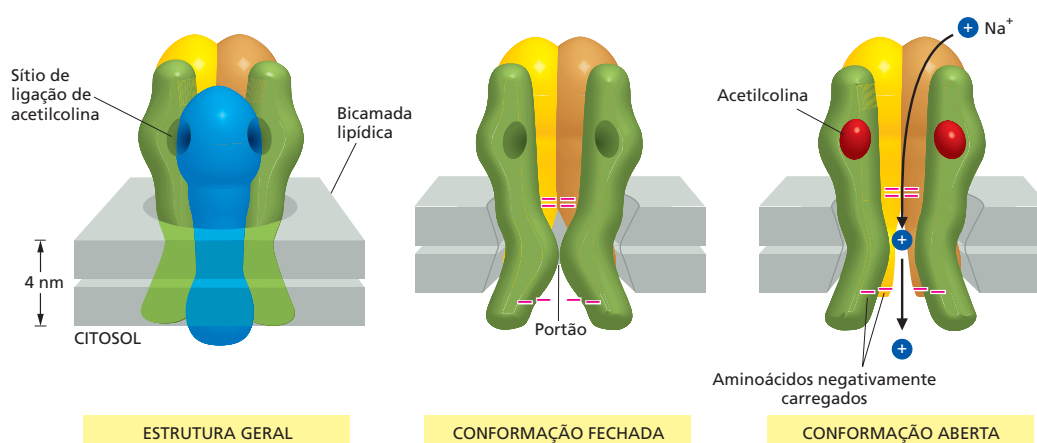



Figura 12-43 O receptor de acetilcolina, presente na membrana plasmática das células musculares, se abre quando se liga ao neurotransmissor acetilcolina liberado por um nervo. (A) Esse canal iônico com portões controlados por transmissor é composto por cinco subunidades proteicas transmembrânicas que se combinam e formam um poro aquoso através da bicamada lipídica. O poro é delineado por cinco α-hélices transmembrânicas, sendo cada uma oriunda da respectiva subunidade. (B) As cadeias laterais de aminoácidos negativamente carregados em cada uma das duas extremidades do poro (indicadas aqui por sinais negativos *vermelhos*) asseguram que apenas os íons positivamente carregados, principalmente Na^+ e K^+, podem passar. A subunidade azul foi removida aqui para mostrar o interior do poro. Quando o canal está em sua conformação fechada, o poro é ocluído (bloqueado) pelas cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos na região denominada portão. (C) Quando a acetilcolina se liga, o canal sofre uma mudança conformacional na qual essas cadeias laterais se afastam e o portão se abre, permitindo o fluxo de Na^+ através da membrana a favor de seu gradiente eletroquímico. O K^+ (não mostrado aqui) fluirá na direção oposta a favor de seu gradiente eletroquímico. Mesmo com a acetilcolina ligada, o canal oscila aleatoriamente entre os estados aberto e fechado (ver Figura 12-24); contudo, sem a ligação de acetilcolina, ele raramente se abre.

de sinapse formada entre um neurônio e uma célula muscular. Em vertebrados, o neurotransmissor da junção é a *acetilcolina*, e o canal iônico controlado por transmissor é o *receptor de acetilcolina* (**Figura 12-43**).

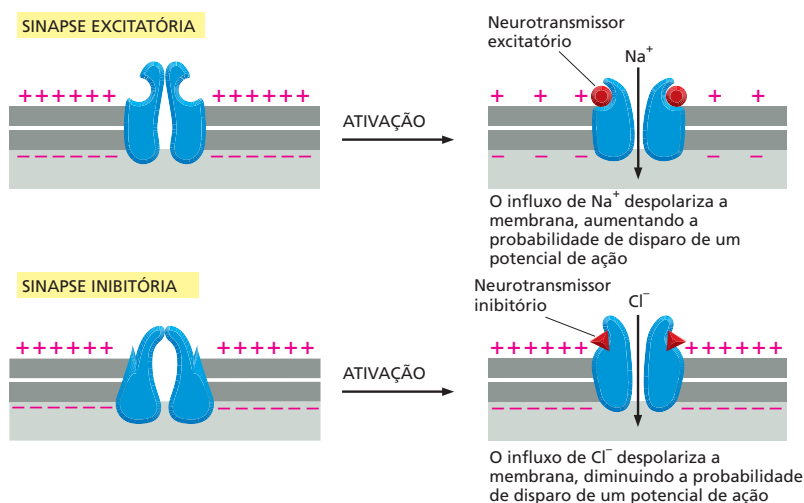
Os neurônios recebem estímulos de informação, tanto excitatórias como inibitórias

A resposta produzida por um neurotransmissor em uma sinapse pode ser excitatória ou inibitória. Os neurotransmissores excitatórios (liberados por terminais axônicos de *neurônios excitatórios*) estimulam a célula pós-sináptica, incitando-a a acionar um potencial de ação. Os neurotransmissores inibitórios (liberados por terminais axônicos de *neurônios inibitórios*) fazem o oposto, desestimulando a célula pós-sináptica a acionar. A droga curare, que os índios sul-americanos usavam para produzir flechas envenenadas e os cirurgiões usam para relaxar os músculos durante uma operação, causa paralisia pelo bloqueio da transmissão de sinais excitatórios nas junções neuromusculares. Por outro lado, a estricnina, um ingrediente comum em venenos de rato, causa espasmos musculares, convulsões e morte pelo bloqueio da transmissão de sinais inibitórios.

Os neurotransmissores excitatórios e inibitórios se ligam a diferentes receptores, e é o caráter do receptor que estabelece a diferença entre excitação e inibição. Os receptores mais importantes de neurotransmissores excitatórios, principalmente a *acetilcolina* e o *glutamato*, são canais de cátions controlados por ligante. Quando o neurotransmissor se liga, os canais se abrem e permitem um influxo de cátions, o que despolariza a membrana plasmática em direção ao potencial limiar necessário para desencadear um potencial de ação. Assim, a estimulação desses receptores tende a ativar a célula pós-sináptica. Em contrapartida, os receptores de neurotransmissores inibitórios, principalmente o *ácido γ-aminobutírico* (*GABA*) e a *glicina*, são canais de Cl^- controlados por ligante. Quando o neurotransmissor se liga, os canais se abrem, mas muito pouco Cl^- entra na célula nesse momento, porque a força motora do movimento de Cl^- através da membrana é próxima a zero no potencial de repouso de membrana. Entretanto, se um neurotransmissor excitatório abrir os canais de Na^+ ao mesmo

QUESTÃO 12-7

Na doença miastenia grave, o corpo humano produz – por engano – anticorpos contra as suas próprias moléculas receptoras de acetilcolina. Esses anticorpos se ligam e inativam os receptores de acetilcolina na membrana plasmática das células musculares. A doença leva a um enfraquecimento progressivo devastador das pessoas afetadas. Logo no início, elas podem ter dificuldade de abrir suas pálpebras, por exemplo, e, em um modelo animal da doença, coelhos têm dificuldade de manter suas orelhas em pé. À medida que a doença progride, a maioria dos músculos enfraquece, e as pessoas com miastenia grave têm dificuldade de falar e engolir. Finalmente, a respiração debilitada pode levar à morte. Explique qual etapa da função muscular é afetada.

Figura 12-44 As sinapses podem ser excitatórias ou inibitórias. Os neurotransmissores excitatórios ativam canais iônicos que permitem a passagem de Na^+ e Ca^{2+}, ao passo que os neurotransmissores inibitórios ativam canais iônicos que permitem a passagem de Cl^-.

tempo, a despolarização resultante, causada pelo influxo de Na^+, fará com que o Cl^- se mova para dentro da célula através dos canais de Cl^- abertos, neutralizando o efeito do influxo de Na^+ (Figura 12-44). Desse modo, os neurotransmissores inibitórios suprimem a produção de um potencial de ação ao tornar muito mais difícil a despolarização da membrana da célula-alvo.

As localizações e as funções desses canais iônicos e de alguns outros canais iônicos discutidos neste capítulo estão resumidas na Tabela 12-3.

Os canais iônicos controlados por transmissor são os principais alvos dos fármacos psicoativos

A maioria dos fármacos usados no tratamento da insônia, da ansiedade, da depressão e da esquizofrenia exerce seus efeitos nas sinapses do cérebro, sendo que muitos deles agem pela ligação a canais iônicos controlados por transmissor. Os barbitúricos e tranquilizantes, como Valium, Ambien e Temazepam, por exemplo, se ligam a canais de Cl^- controlados por GABA. Sua ligação faz com que os

TABELA 12-3 Alguns exemplos de canais iônicos

Canal iônico	Localização típica	Função
Canal de vazamento de K^+	Membrana plasmática da maioria das células animais	Manutenção do potencial de repouso de membrana
Canal de Na^+ controlado por voltagem	Membrana plasmática do axônio de células nervosas	Geração de potenciais de ação
Canal de K^+ controlado por voltagem	Membrana plasmática do axônio de células nervosas	Retorno da membrana ao potencial de repouso após a iniciação de um potencial de ação
Canal de Ca^{2+} controlado por voltagem	Membrana plasmática do terminal nervoso	Estimulação da liberação de neurotransmissor
Receptor de acetilcolina (canal de Ca^{2+} e Na^+ controlado por acetilcolina)	Membrana plasmática de células musculares (em junções neuromusculares)	Sinalização sináptica excitatória
Receptores de glutamato (canais de Ca^{2+} e Na^+ controlados por glutamato)	Membrana plasmática de muitos neurônios (em sinapses)	Sinalização sináptica excitatória
Receptor de GABA (canal de Cl^- controlado por GABA)	Membrana plasmática de muitos neurônios (em sinapses)	Sinalização sináptica inibitória
Receptor de glicina (canal de Cl^- controlado por glicina)	Membrana plasmática de muitos neurônios (em sinapses)	Sinalização sináptica inibitória
Canal de cátion ativado por estresse	Célula do pelo auditivo no ouvido interno	Detecção de vibrações sonoras

Figura 12-45 Milhares de sinapses se formam no corpo celular e nos dendritos de um neurônio motor na medula espinal. (A) Muitos milhares de terminais nervosos fazem sinapse no neurônio, transmitindo sinais de outras partes do animal para controlar o disparo de potenciais de ação ao longo do axônio do neurônio. (B) Uma célula nervosa de rato em cultura. Seu corpo celular e os dendritos (*verde*) estão corados com um anticorpo fluorescente que reconhece uma proteína do citoesqueleto. Milhares de terminais do axônio (*vermelho*) de outras células nervosas (não visíveis) fazem sinapses na superfície da célula; elas estão coradas com um anticorpo fluorescente que reconhece uma proteína nas vesículas sinápticas. Os sinais elétricos são enviados ao longo dos axônios, retransmitidos através das sinapses e passados adiante ao longo dos dendritos em direção ao corpo celular nervoso. A sinalização depende do movimento de íons através das membranas plasmáticas das células nervosas. (B, cortesia de Olaf Mundigl e Pietro de Camilli.)

canais se abram mais facilmente por GABA, tornando, assim, a célula mais sensível à ação inibitória de GABA. Por outro lado, o antidepressivo Prozac bloqueia a recaptação de um neurotransmissor excitatório, a *serotonina*, aumentando a quantidade de serotonina disponível naquelas sinapses que utilizam esse transmissor. Ainda é um mistério por que isso deve amenizar a depressão.

O número de tipos distintos de receptores de neurotransmissores é muito grande, embora eles se enquadrem em um número pequeno de famílias. Há, por exemplo, muitos subtipos de receptores de acetilcolina, glutamato, GABA, glicina e serotonina. Em geral, eles se localizam em diferentes neurônios e frequentemente diferem apenas de modo sutil quanto às suas propriedades. Com tamanha variedade de receptores, pode ser possível projetar uma nova geração de fármacos psicoativos que agirão mais seletivamente em conjuntos específicos de neurônios para aliviar as doenças mentais que assolam a vida de tantas pessoas. Um por cento da população humana, por exemplo, tem esquizofrenia, outro um por cento tem transtorno bipolar, e uma porcentagem muito maior sofre de ansiedade ou depressão.

As conexões sinápticas lhe permitem pensar, agir e recordar

Em uma sinapse, o terminal nervoso da célula pré-sináptica converte um sinal elétrico em um sinal químico, e a célula pós-sináptica converte o sinal químico novamente em um sinal elétrico. A interferência nesses processos, para o bem ou para o mal, é de enorme importância prática para nós. Por que a evolução favoreceu tal modo aparentemente ineficiente de passar adiante um sinal elétrico? Pareceria mais eficiente possuir uma conexão elétrica direta entre as células pré e pós-sinápticas ou livrar-se totalmente das sinapses e usar uma única célula contínua.

O valor das sinapses que podem manejar os sinais químicos se torna claro quando consideramos como elas funcionam no contexto do sistema nervoso – uma imensa rede de neurônios, interconectados por muitas rotas ramificadas, que executam cálculos complexos, armazenam memórias e geram planos de ação. Para realizar essas funções, os neurônios têm de fazer mais do que meramente gerar e retransmitir sinais: eles também devem combiná-los, interpretá-los e registrá-los. As sinapses químicas tornam essas atividades possíveis. Um neurônio motor na medula espinal, por exemplo, recebe entradas de infor-

mação de centenas ou milhares de outros neurônios que fazem sinapses com ele (**Figura 12-45**). Alguns desses sinais tendem a estimular o neurônio, e outros tendem a inibi-lo. O neurônio motor tem de combinar todas as informações que recebe e reagir disparando potenciais de ação ao longo de seu axônio, a fim de estimular um músculo ou permanecer quieto.

Essa tarefa de computar uma saída apropriada para a balbúrdia cacofônica de entradas de informação é obtida por uma interação complicada entre os diferentes tipos de canais iônicos presentes na membrana plasmática do neurônio. Cada uma das centenas de tipos de neurônios em seu cérebro possui seu próprio conjunto característico de receptores e canais iônicos que permite à célula responder de modo específico a um certo conjunto de entradas de informação e, assim, realizar sua tarefa especializada. Além disso, os canais iônicos e outros componentes em uma sinapse também podem passar por modificações permanentes de acordo com o uso que sofreram, preservando, desse modo, impressões de eventos passados. Dessa maneira, as memórias são armazenadas. Os canais iônicos, portanto, estão no centro da maquinaria que lhe permite agir, pensar, sentir, falar e – talvez o mais importante de tudo – se recordar de tudo o que você leu em livros como este.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- **A bicamada lipídica das membranas celulares é permeável a moléculas apolares pequenas, como o oxigênio e o dióxido de carbono, e a moléculas polares muito pequenas, como a água. Ela é altamente impermeável à maioria das moléculas grandes solúveis em água e a todos os íons. A transferência de nutrientes, metabólitos e íons através da membrana plasmática e das membranas celulares internas é realizada por proteínas de transporte de membrana.**
- **As membranas celulares contêm uma série de proteínas de transporte, sendo cada uma responsável pela transferência de um tipo específico de soluto através da membrana. Há duas classes de proteínas de transporte de membrana: os transportadores e os canais.**
- **O gradiente eletroquímico representa a força motora líquida de um íon em virtude do seu gradiente de concentração e do campo elétrico.**
- **No transporte passivo, um soluto não carregado se move espontaneamente a favor de seu gradiente de concentração, um soluto carregado (um íon) se move espontaneamente a favor de seu gradiente eletroquímico, e a água se move a favor de seu gradiente osmótico. No transporte ativo, um soluto não carregado ou um íon é transportado contra seu gradiente de concentração ou eletroquímico em um processo que requer energia.**
- **Os transportadores se ligam a solutos específicos (íons inorgânicos, moléculas orgânicas pequenas ou ambos) e os transferem através da bicamada lipídica, sofrendo mudanças conformacionais que expõem o sítio de ligação do soluto primeiro em um lado da membrana e depois no outro.**
- **Os transportadores podem funcionar como bombas para mover um soluto desfavoravelmente contra seu gradiente eletroquímico, usando energia proveniente da hidrólise de ATP, de um fluxo favorável de íons Na^+ ou H^+ ou da luz.**
- **A bomba de Na^+-K^+ na membrana plasmática das células animais é uma ATPase que transporta ativamente Na^+ para fora da célula e K^+ para dentro, mantendo o gradiente de Na^+ elevado ao longo da membrana plasmática, o qual é usado para direcionar outros processos de transporte ativo e para transmitir sinais elétricos.**
- **Os canais formam poros aquosos através da bicamada lipídica pelos quais os solutos podem difundir-se. Enquanto a transferência de solutos**

realizada por transportadores pode ser ativa ou passiva, o transporte por canais sempre é passivo.

- Os canais são, em sua maioria, canais iônicos seletivos que permitem a íons inorgânicos de tamanho e carga apropriados atravessar a membrana a favor de seus gradientes eletroquímicos. O transporte através de canais iônicos é no mínimo 1.000 vezes mais rápido do que o movimento através de qualquer transportador conhecido. Outros canais conduzem a água ou outros metabólitos pequenos.
- A maioria dos canais iônicos é controlada por portões; eles se abrem transitoriamente em resposta a um estímulo específico, tal como uma mudança no potencial de membrana (canais controlados por voltagem) ou a ligação de um ligante (canais controlados por ligante).
- Mesmo quando abertos por seu estímulo específico, os canais iônicos não permanecem continuamente abertos: eles oscilam aleatoriamente entre as conformações aberta e fechada. Um estímulo ativador aumenta a proporção de tempo que o canal passa no estado aberto.
- O potencial de membrana é determinado pela distribuição desigual de cargas elétricas nos dois lados da membrana plasmática e é alterado quando os íons fluem através de canais abertos. Na maioria das células animais, os canais seletivos de escoamento de K^+ mantêm o potencial de membrana de repouso em um valor negativo, próximo ao valor no qual a força motora para o movimento de K^+ através da membrana é quase zero.
- Os neurônios propagam sinais na forma de potenciais de ação, os quais podem percorrer grandes distâncias ao longo de um axônio sem que enfraqueçam. Os potenciais de ação são normalmente mediados por canais de Na^+ controlados por voltagem que se abrem em resposta à despolarização da membrana plasmática.
- Os canais de Ca^{2+} controlados por voltagem nos terminais nervosos acoplam os sinais elétricos à liberação de transmissores nas sinapses. Os canais iônicos controlados por transmissor convertem esses sinais químicos novamente em sinais elétricos na célula-alvo pós-sináptica.
- Os neurotransmissores excitatórios abrem os canais controlados por transmissor que são permeáveis a Na^+ e, assim, despolarizam a membrana da célula pós-sináptica em direção ao potencial limiar para o disparo de um potencial de ação. Os neurotransmissores inibitórios abrem os canais de Cl^- controlados por transmissor e, assim, suprimem o disparo ao manter a membrana da célula pós-sináptica polarizada.

TERMOS-CHAVE

axônio
bomba de Na^+-K^+
canal
canal controlado por estresse
canal controlado por ligante
canal controlado por voltagem
canal de Na^+ controlado por voltagem
canal iônico
equação de Nernst
gradiente eletroquímico
neurônio
neurotransmissor
osmose
proteína de transporte de membrana
potencial de ação
potencial de membrana
pressão osmótica
registro de *patch-clamp*
sinapse
terminal nervoso
transportador
transportador acoplado
transporte ativo
transporte passivo
vesícula sináptica

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 12-8

O diagrama da Figura 12-6 mostra um transportador passivo que medeia a transferência de um soluto a favor de seu gradiente de concentração através da membrana. Como você precisaria mudar o diagrama para converter o transportador em uma bomba que move o soluto contra seu gradiente eletroquímico pela hidrólise de ATP? Explique a necessidade de cada uma das etapas em sua nova ilustração.

QUESTÃO 12-9

Quais das seguintes afirmações estão corretas? Explique suas respostas.

A. A membrana plasmática é altamente impermeável a todas as moléculas carregadas.

B. Os canais devem primeiro ligar-se às moléculas de soluto antes que possam selecionar aquelas que permitirão passar.

C. Os transportadores permitem que os solutos atravessem uma membrana a taxas muito mais rápidas do que os canais.

D. Certas bombas de H^+ são abastecidas por energia luminosa.

E. A membrana plasmática de muitas células animais contém canais de K^+ abertos, ainda que a concentração de K^+ no citosol seja muito mais alta do que no exterior da célula.

F. Um simporte funcionaria como um antiporte se sua orientação na membrana fosse invertida (isto é, se a porção da molécula normalmente exposta ao citosol se voltasse para o lado de fora da célula).

G. O potencial de membrana de um axônio se torna temporariamente mais negativo quando um potencial de ação o excita.

QUESTÃO 12-10

Liste os seguintes compostos em ordem crescente de permeabilidade à bicamada lipídica: RNA, Ca^{2+}, glicose, etanol, N_2, água.

QUESTÃO 12-11

Mencione pelo menos uma similaridade e pelo menos uma diferença entre os seguintes termos (dica: rever as definições dos termos usando o Glossário):

A. Simporte e antiporte

B. Transporte ativo e transporte passivo

C. Potencial de membrana e gradiente eletroquímico

D. Bomba e transportador

E. Axônio e linha telefônica

F. Soluto e íon

QUESTÃO 12-12

Discuta a seguinte afirmação: "As diferenças entre um canal e um transportador são como as diferenças entre uma ponte e uma balsa".

QUESTÃO 12-13

O neurotransmissor acetilcolina é produzido no citosol e então transportado para dentro de vesículas sinápticas, onde sua concentração é mais de 100 vezes mais alta do que no citosol. Quando as vesículas sinápticas são isoladas dos neurônios, elas podem absorver mais acetilcolina adicionada à solução na qual se encontram suspensas, mas somente quando o ATP está presente. Os íons Na^+ não são necessários à absorção de acetilcolina; porém, curiosamente, a elevação do pH da solução na qual as vesículas sinápticas se encontram suspensas aumenta a taxa de absorção de acetilcolina. Além disso, o transporte é inibido quando fármacos que tornam a membrana permeável a íons H^+ são adicionados. Sugira um mecanismo que seja consistente com todas essas observações.

QUESTÃO 12-14

O potencial de membrana de repouso de uma célula é cerca de –70 mV, e a espessura de uma bicamada lipídica é cerca de 4,5 nm. Qual é a força do campo elétrico através da membrana em V/cm? O que você supõe que aconteceria se você aplicasse essa força do campo a dois eletrodos metálicos separados por um espaço, com ar, de 1 cm?

QUESTÃO 12-15

As bicamadas fosfolipídicas formam vesículas esféricas seladas na água (discutido no Capítulo 11). Suponha que você tenha construído vesículas lipídicas que contenham bombas de Na^+-K^+ como as únicas proteínas de membrana e que, a título de simplicidade, cada bomba transporte um Na^+ em uma direção e um K^+ na outra direção em cada ciclo de bombeamento. Todas as bombas de Na^+-K^+ têm a porção da molécula que normalmente se volta para o citosol orientada em direção ao exterior das vesículas. Com a ajuda da Figura 12-11, determine o que aconteceria se:

A. suas vesículas fossem suspensas em uma solução contendo tanto íons Na^+ como íons K^+ e tivessem uma solução com a mesma composição iônica dentro delas.

B. você adicionasse ATP à suspensão descrita em (A).

C. você adicionasse ATP, mas a solução – tanto no exterior como no interior das vesículas – contivesse apenas íons Na^+ e nenhum íon K^+.

D. metade das moléculas da bomba incrustadas na membrana de cada vesícula fosse orientada ao contrário, de modo que as porções normalmente citosólicas dessas moléculas se voltassem para o interior das vesículas. Você agora adiciona ATP à suspensão.

E. você adicionasse ATP à suspensão descrita em (A), mas, além das bombas de Na^+-K^+, a membrana de suas vesículas também contivesse canais de escoamento de K^+.

QUESTÃO 12-16

Mencione os três modos pelos quais um canal iônico pode ser controlado.

QUESTÃO 12-17

Mil canais de Ca^{2+} se abrem na membrana plasmática de uma célula que possui 1.000 μm^3 de tamanho e uma concentração citosólica de Ca^{2+} de 100 nM. Por quanto tempo os canais precisariam permanecer abertos, a fim de que a concentração citosólica de Ca^{2+} suba para 5 μM? Há praticamente Ca^{2+} ilimitado disponível no meio externo (a concentração extracelular de Ca^{2+} na qual a maioria das células animais vive é de alguns milimolares) e, por canal, passam 10^6 íons Ca^{2+} por segundo.

QUESTÃO 12-18

Os aminoácidos são absorvidos pelas células animais usando um simporte na membrana plasmática. Qual é o íon mais provável cujo gradiente eletroquímico direciona a importação? O ATP é consumido no processo? Em caso afirmativo, como?

QUESTÃO 12-19

Veremos, no Capítulo 15, que um pH ácido no interior dos endossomos, que são organelas intracelulares envoltas por membrana, é necessário à sua função. A acidificação é obtida graças a uma bomba de H^+ na membrana endossômica. A membrana endossômica também contém canais de Cl^-. Se os canais não funcionarem apropriadamente (p. ex., em virtude de uma mutação nos genes codificantes das proteínas canal), a acidificação também será prejudicada.

A. Você pode explicar como os canais de Cl^- poderiam ajudar na acidificação?

B. De acordo com sua explicação, os canais da Cl^- seriam absolutamente necessários para diminuir o pH dentro do endossomo?

QUESTÃO 12-20

Algumas células bacterianas podem crescer tanto em etanol (CH_3CH_2OH) como em acetato (CH_3COO^-) como sua única fonte de carbono. O Dr. Schwips mediu a taxa na qual os dois compostos atravessam a membrana plasmática bacteriana; mas, em virtude da inalação excessiva de um dos compostos (qual deles?), não anotou seus dados corretamente.

Concentração da fonte de carbono (mM)	Taxa de transporte (μmol/min)	
	Composto A	Composto B
0,1	2,0	18
0,3	6,0	46
1,0	20	100
3,0	60	150
10,0	200	182

A. Represente graficamente os dados da tabela.

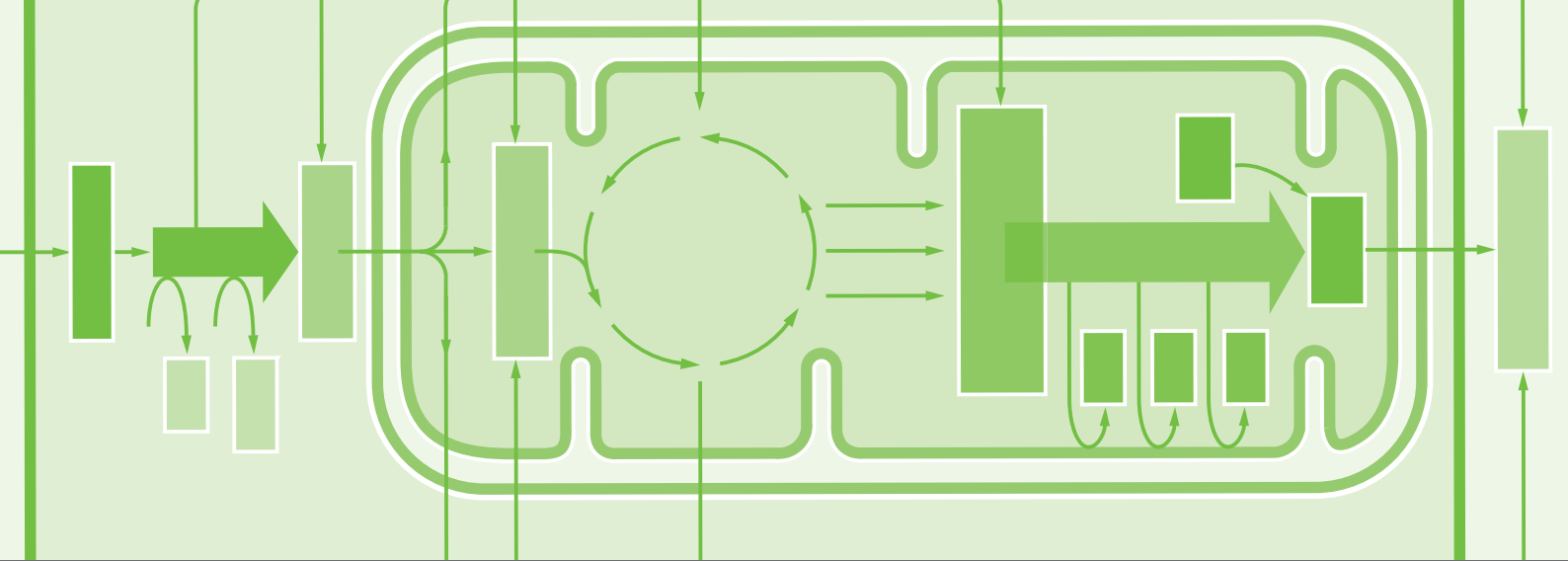
B. Determine a partir de seu gráfico se os dados que descrevem o composto A correspondem à absorção de etanol ou acetato.

C. Determine as taxas de transporte para os compostos A e B a 0,5 mM e 100 mM. (Essa parte da questão exige que você esteja familiarizado com os princípios de cinética enzimática discutidos no Capítulo 3.)
Explique suas respostas.

QUESTÃO 12-21

Os canais de cátions controlados por acetilcolina não distinguem entre os íons Na^+, K^+ e Ca^{2+}, permitindo que todos passem livremente por eles. Assim, por que, quando a acetilcolina se liga a esse complexo proteico nas células musculares, o canal se abre e há um grande influxo líquido primariamente de íons Na^+?

QUESTÃO 12-22

Os canais iônicos que são regulados pela ligação de neurotransmissores, como a acetilcolina, o glutamato, o GABA ou a glicina, possuem uma estrutura geral similar. Todavia, cada uma das classes desses canais consiste em um conjunto muito diverso de subtipos com diferentes afinidades por ligantes, diferentes condutâncias de canal e diferentes taxas de abertura e fechamento. Você imagina que essa diversidade extrema seja algo bom ou ruim do ponto de vista da indústria farmacêutica?

CAPÍTULO 13

Como as Células Obtêm Energia a partir dos Alimentos

A QUEBRA E A UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES E GORDURAS

REGULAÇÃO DO METABOLISMO

Como discutido no Capítulo 3, as células necessitam de um constante suprimento de energia para gerar e manter a ordem biológica que as mantêm vivas. Essa energia provém da energia das ligações químicas das moléculas de alimento, as quais, portanto, servem de combustível para as células.

Talvez as mais importantes moléculas combustíveis sejam os açúcares. As plantas produzem seus próprios açúcares a partir de CO_2 pela fotossíntese. Os animais obtêm açúcares – e outras moléculas, como o amido, que são facilmente quebradas em açúcares – alimentando-se de outros organismos. Todavia, o processo pelo qual esses açúcares são oxidados para gerar energia é muito semelhante tanto em animais como em plantas. Em ambos os casos, as células que formam o organismo obtêm energia útil a partir da energia das ligações químicas contidas nos açúcares quando a molécula de açúcar é quebrada e oxidada a dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O). Essa energia é armazenada na forma de ligações químicas de "alta energia" – ligações covalentes que liberam grandes quantidades de energia quando hidrolisadas – em moléculas carreadoras ativadas, como ATP e NADPH. Essas moléculas carreadoras, por sua vez, servem de fontes portáteis de grupos químicos e elétrons necessários para a biossíntese (discutido no Capítulo 3).

Neste capítulo, traçamos as principais etapas da quebra – ou *catabolismo* – de açúcares e demonstramos como essa oxidação produz ATP, NADH e outras moléculas carreadoras ativadas nas células. Concentramo-nos na quebra da glicose, porque essas reações dominam a produção de energia na maioria das células animais. Uma via muito semelhante funciona em plantas, fungos e muitas bactérias. Outras moléculas, como ácidos graxos e proteínas, também podem servir de fonte de energia se forem convergidas pelas vias enzimáticas apropriadas. Também veremos como várias moléculas geradas a partir da quebra dos açúcares e gorduras podem ser utilizadas para construir as macromoléculas nas células.

Finalmente, examinaremos como as células regulam seu metabolismo e como armazenam moléculas de alimento para suas necessidades metabólicas futuras. Reservaremos nossa discussão sobre como as células produzem a maior parte do ATP que necessitam para o Capítulo 14.

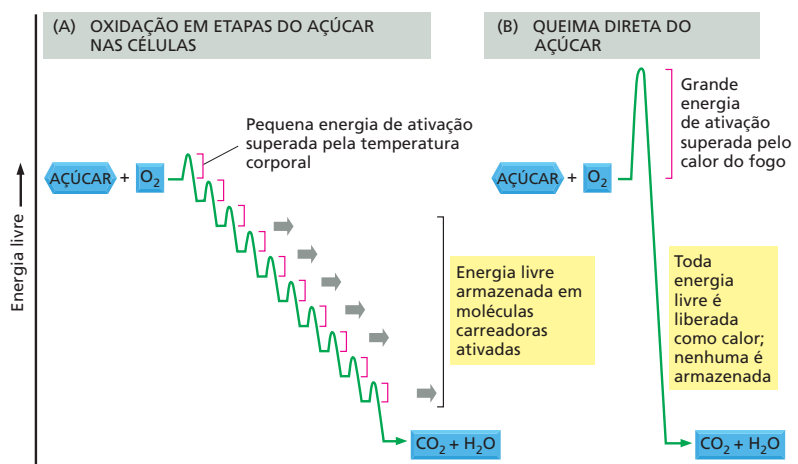
A QUEBRA E A UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES E GORDURAS

Se uma molécula combustível como a glicose fosse oxidada em CO_2 e H_2O em uma única etapa (como acontece em sistemas inanimados), ela liberaria uma quantidade de energia muitas vezes maior do que a que qualquer molécula carreadora poderia capturar. Ao contrário, células vivas utilizam enzimas para conduzir a oxidação dos açúcares em uma série de reações rigorosamente controladas. Como ilustrado na **Figura 13-1**, a molécula de glicose é degradada passo a passo, despendendo energia em pequenos pacotes para ativar moléculas carreadoras por meio de reações acopladas. Dessa forma, grande parte da energia liberada pela oxidação da glicose é preservada, em ligações de alta energia de ATP e outras moléculas carreadoras ativadas, e disponibilizada para exercer trabalho útil para a célula.

As células animais produzem ATP de duas maneiras. Primeiro, certas etapas em uma série de reações catalisadas por enzimas são diretamente acopladas à reação energeticamente desfavorável **ADP** + $P_i \rightarrow$ **ATP**. A oxidação de moléculas de alimento fornece energia que permite que essa reação desfavorável ocorra. Entretanto, a maior parte da síntese de ATP ocorre na mitocôndria e utiliza a energia de moléculas carreadoras ativadas para conduzir a produção de ATP; esse processo envolve a membrana mitocondrial e será descrito em detalhe no Capítulo 14. Neste capítulo, enfocaremos a primeira sequência de reações pela qual as moléculas de alimento são oxidadas – tanto no citosol como no interior das mitocôndrias. Essas reações produzem tanto ATP quanto as moléculas carreadoras ativadas que conduzirão a produção de quantidades muito maiores de ATP nas membranas das mitocôndrias.

As moléculas de alimento são quebradas em três estágios

As proteínas, os lipídeos e os polissacarídeos que compõem a maior parte do alimento que consumimos devem ser antes quebrados em moléculas menores para que nossas células possam utilizá-los – tanto como fonte de energia quanto como subunidades estruturais para outras moléculas. O processo de quebra – que utiliza enzimas para degradar moléculas complexas em moléculas mais simples – é chamado de **catabolismo**. O catabolismo deve agir sobre alimentos

Figura 13-1 A oxidação controlada do açúcar em etapas que ocorre na célula preserva energia útil, ao contrário da simples queima da mesma molécula combustível. Na célula, as enzimas catalisam oxidações por uma série de pequenas etapas nas quais a energia livre é transferida em pacotes convenientemente arranjados para as moléculas carreadoras – mais frequentemente ATP e NADH. A cada etapa, uma enzima controla a reação reduzindo a barreira da energia de ativação que deve ser transposta pela colisão randômica das moléculas na temperatura das células (temperatura corporal), de modo que permita que uma reação específica possa ocorrer. O total de energia livre liberado pela oxidação de glicose – 686 kcal/mol (2.880 kJ/mol) – é exatamente o mesmo em (A) e em (B).

vindos do exterior, porém não sobre as macromoléculas do interior de nossas próprias células. Portanto, o estágio 1 da quebra enzimática de moléculas de alimento – a *digestão* – ocorre ou no exterior celular (em nosso intestino) ou em uma organela especializada dentro das células chamada de lisossomo. Uma membrana que circunda o lisossomo mantém suas enzimas digestórias separadas do citosol (discutido no Capítulo 15).

As enzimas digestórias reduzem as grandes moléculas poliméricas do alimento em subunidades monoméricas: proteínas em aminoácidos, polissacarídeos em açúcares e gorduras em ácidos graxos e glicerol. Após a digestão, as pequenas moléculas orgânicas derivadas do alimento entram no citosol da célula, onde sua oxidação gradual inicia. Como ilustrado na **Figura 13-2**, essa oxidação ocorre em dois outros estágios adicionais: o estágio 2 se inicia no citosol e termina nas mitocôndrias, e o estágio 3 é confinado nas mitocôndrias.

No estágio 2 do catabolismo celular, uma cadeia de reações chamada de *glicólise* converte cada molécula de *glicose* em duas moléculas menores de *piruvato*. Outros açúcares que não a glicose também podem ser utilizados depois de serem primeiro convertidos a um dos açúcares intermediários dessa via glicolítica. Durante a formação do piruvato, dois tipos de moléculas carreadoras ativadas são produzidos – ATP e NADH. O piruvato é então transportado do citosol para o compartimento interno, ou *matriz,* da mitocôndria. Lá, um complexo enzimático gigante converte cada molécula de piruvato em CO_2 mais **acetil-CoA**, outra das moléculas carreadoras ativadas discutidas no Capítulo 3 (ver Figura 3-36). Grandes quantidades de acetil-CoA também são produzidas pela quebra em etapas e pela oxidação de ácidos graxos derivados das gorduras.

O estágio 3 da quebra oxidativa das moléculas de alimento ocorre inteiramente nas mitocôndrias. O grupo acetila em acetil-CoA é transferido para uma molécula denominada oxaloacetato para formar citrato, que entra em uma série de reações chamadas de *ciclo do ácido cítrico*. O grupo acetila transferido é oxidado a CO_2 nessas reações, e grande quantidade do carreador de elétrons de alta energia NADH é gerada. Finalmente, os elétrons de alta energia de NADH são passados ao longo de uma série de enzimas dentro da membrana mitocondrial interna chamada de *cadeia transportadora de elétrons*, onde a energia liberada pela sua transferência é utilizada para conduzir o processo que produz ATP e consome oxigênio molecular (gás O_2). São nessas etapas finais que a maior parte da energia liberada pela oxidação é aproveitada para produzir a maior parte de ATP celular.

Por meio da produção de ATP, a energia derivada da quebra de açúcares e gorduras é redistribuída como pacotes de energia química em uma forma conveniente para utilização na célula. Aproximadamente 10^9 moléculas de ATP estão em solução em uma célula típica a qualquer instante, e, em muitas células, todo o seu ATP é renovado (isto é, usado e reposto) a cada 1-2 minutos. Uma pessoa em repouso hidrolisará seu peso em moléculas de ATP a cada 24 horas.

No total, quase a metade da energia que poderia em teoria ser derivada da oxidação da glicose ou dos ácidos graxos a H_2O e CO_2 é capturada e utilizada para conduzir a reação energeticamente desfavorável P_i + ADP → ATP. Em contrapartida, uma máquina moderna de combustão, como o motor de um carro, não pode converter mais de 20% da energia disponível em seu combustível em trabalho útil. Nos dois casos, o restante da energia é liberado na forma de calor, o que em animais auxilia a manter os corpos quentes.

A glicólise é uma via central de produção de ATP

O mais importante processo do estágio 2 da quebra de moléculas de alimento é a degradação da **glicose** na sequência de reações conhecidas como **glicólise** – do grego *glykys,* "doce", e *lysis,* "divisão". A glicólise produz ATP sem o envolvimento de O_2. Ela ocorre no citosol da maioria das células, incluindo muitos organismos anaeróbios. A glicólise provavelmente evoluiu cedo na história da vida, antes de os organismos fotossintéticos introduzirem o oxigênio na atmosfera.

Durante a glicólise, uma molécula de glicose, com seis átomos de carbono, é clivada em duas moléculas de **piruvato**, cada uma das quais contendo três átomos de carbono. Para cada molécula de glicose, duas moléculas de ATP são consumidas para prover energia para conduzir as etapas iniciais, porém quatro moléculas de ATP são produzidas nas etapas finais. Portanto, no final da glicólise, há um ganho líquido de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose quebrada.

A glicólise envolve uma sequência de 10 reações separadas, cada uma produzindo um açúcar intermediário diferente e cada uma catalisada por uma enzi-

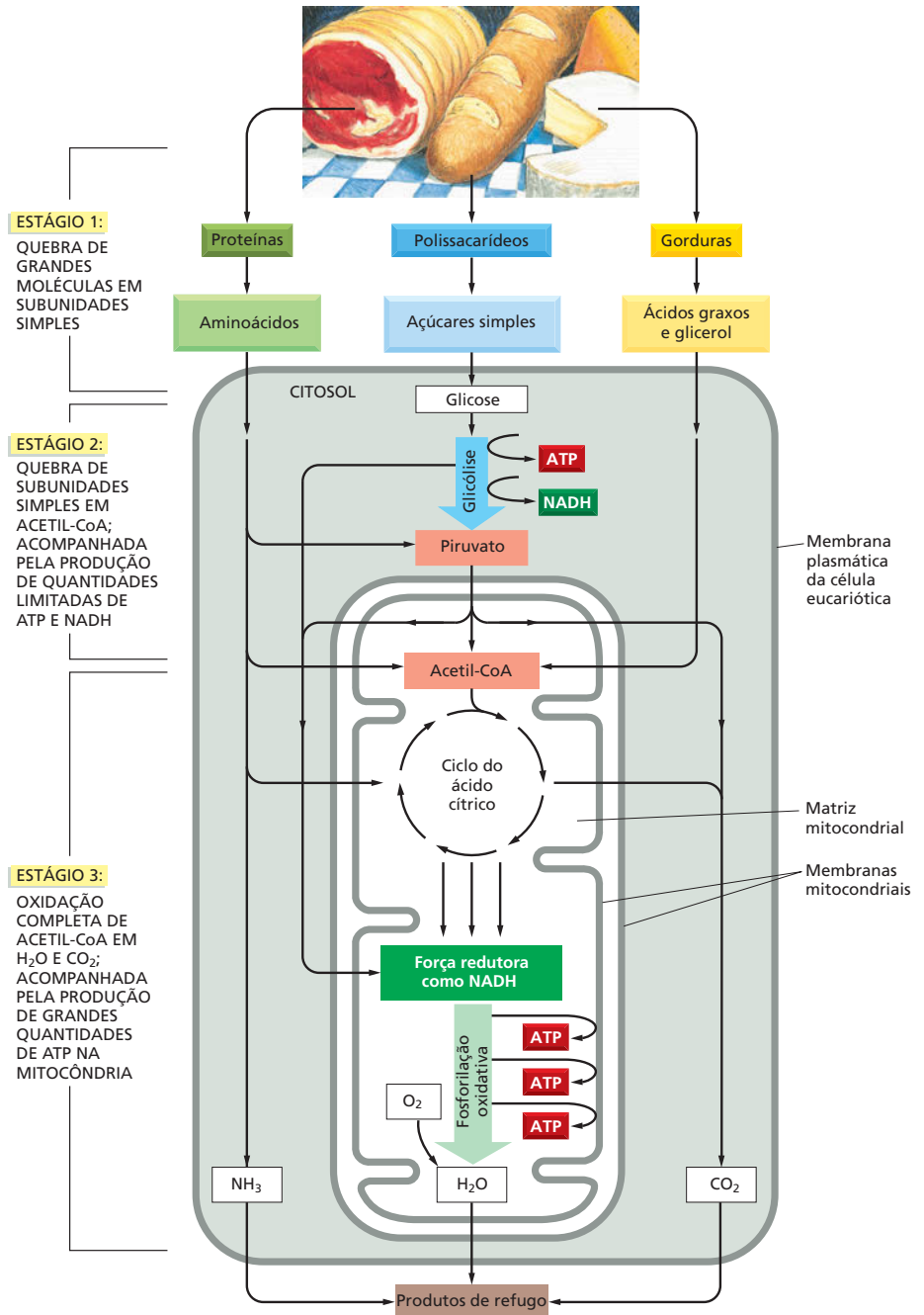



Figura 13-2 Os três estágios do metabolismo celular que vão do alimento ao produto de refugo em células animais. Essa série de reações produz ATP, a qual pode então ser utilizada para conduzir reações biossintéticas e outros processos dependentes de energia na célula. O estágio 1 ocorre principalmente fora das células – embora organelas especializadas denominadas lisossomos possam digerir grandes moléculas no interior celular. O estágio 2 ocorre principalmente no citosol, exceto pela etapa final de conversão do piruvato em grupamentos acetila na acetil-CoA, a qual ocorre na mitocôndria. O estágio 3 ocorre inteiramente na mitocôndria.

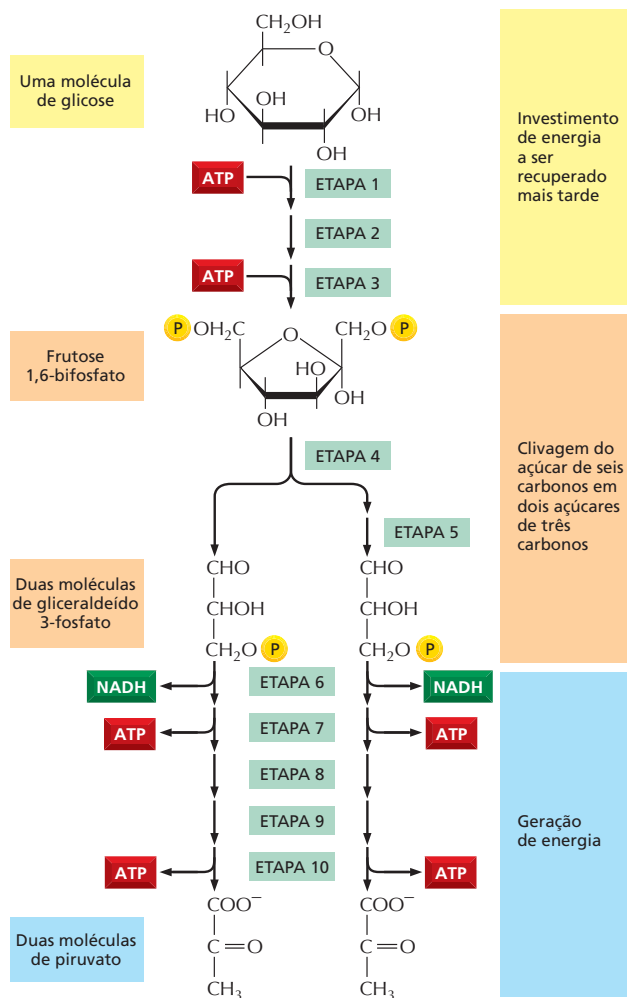



Figura 13-3 A oxidação em etapas dos açúcares começa com a glicólise. Cada uma das 10 etapas da glicólise é catalisada por uma enzima diferente. Observe que a etapa 4 cliva um açúcar de seis carbonos em dois açúcares de três carbonos, de forma que o número de moléculas nos estágios posteriores dobra. Como indicado, a etapa 6 inicia a fase de geração de energia da glicólise, a qual resulta na síntese líquida de ATP e NADH (ver também Painel 13-1). A glicólise é também, às vezes, chamada via Embden-Meyerhof, referindo ao nome dos químicos que a descreveram pela primeira vez. Todas as etapas da glicólise são revisadas na Animação 13.1.

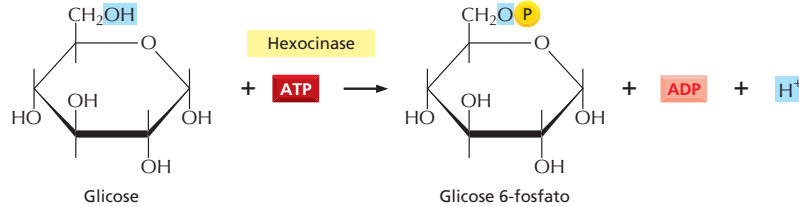
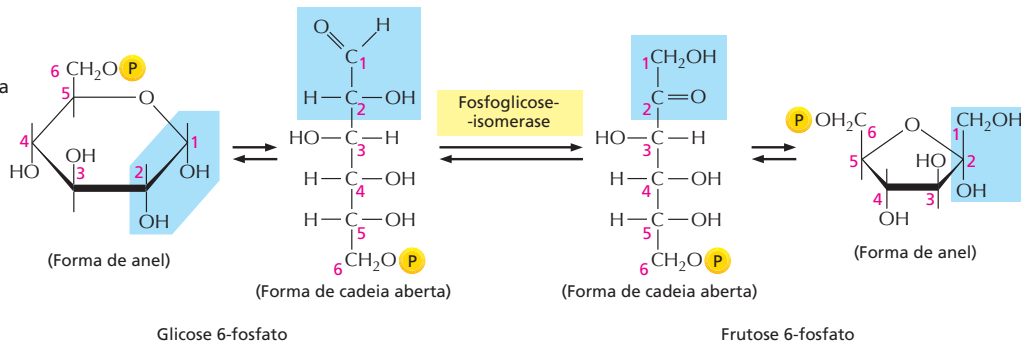
ma diferente. Essas reações estão apresentadas de forma resumida na Figura 13-3 e em mais detalhes no Painel 13-1 (p. 430-431). Como a maioria das enzimas (discutidas no Capítulo 4), as enzimas que catalisam a glicólise possuem nomes que terminam em *-ase* – como *isomerase* e *desidrogenase* –, os quais especificam o tipo de reação que elas catalisam.

Embora o oxigênio molecular não esteja envolvido na glicólise, a oxidação ocorre: elétrons são removidos de alguns carbonos derivados da molécula de glicose pela **NAD^+**, produzindo **NADH**. A natureza gradual do processo permite que a energia da oxidação seja liberada em pacotes pequenos, de forma que grande quantidade dela possa ser armazenada em moléculas carreadoras, em vez de ser liberada na forma de calor (ver Figura 13-1). Parte da energia liberada por essa oxidação conduz a síntese de moléculas de ATP a partir de ADP e P_i. A síntese de ATP na glicólise é conhecida como *fosforilação em nível de substrato*, pois ocorre pela transferência de um grupo fosfato diretamente a partir de uma molécula de substrato – um intermediário de açúcar – até ATP. O restante da energia obtida durante a glicólise é armazenada nos elétrons em NADH.

Duas moléculas de NADH são formadas por molécula de glicose no curso da glicólise. Em organismos aeróbios, essas moléculas de NADH doam seus elétrons para a cadeia transportadora de elétrons, como descrito em detalhes no Capítulo 14. Os elétrons são passados ao longo dessa cadeia para o O_2, forman-

PAINEL 13-1 Detalhes das 10 etapas da glicólise

Para cada etapa, a parte da molécula que sofre uma mudança é sombreada em azul, e o nome da enzima que catalisa a reação está em uma caixa amarela. Para assistir a um vídeo das reações da glicólise, ver Animação 13.1.

Etapa 1 A glicose é fosforilada por ATP para formar um açúcar fosfato. A carga negativa do fosfato previne a passagem do açúcar através da membrana plasmática, prendendo a glicose dentro da célula.

Etapa 2 Um rearranjo prontamente reversível da estrutura química (isomerização) desloca o oxigênio carbonílico do carbono 1 para o carbono 2, formando uma cetose a partir de uma aldose. (Ver Painel 2-3, p. 68-69).

Etapa 3 O novo grupo hidroxila no carbono 1 é fosforilado pelo ATP em preparação para a formação de dois açúcares fosfato de três carbonos. A entrada de açúcares na glicólise é controlada nessa etapa, pela regulação da enzima *fosfofrutocinase*.

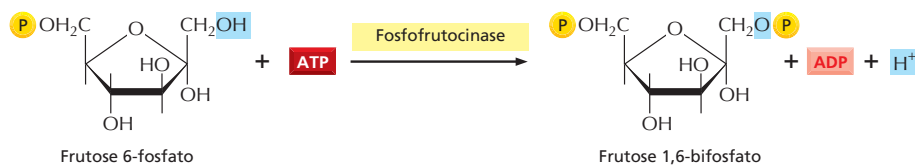
Fosfofrutocinase

ATP

ADP

H^+

Frutose 6-fosfato

Frutose 1,6-bifosfato

Etapa 4 O açúcar de seis carbonos é clivado para produzir duas moléculas de três carbonos. Apenas o gliceraldeído 3-fosfato pode prosseguir imediatamente através da glicólise.

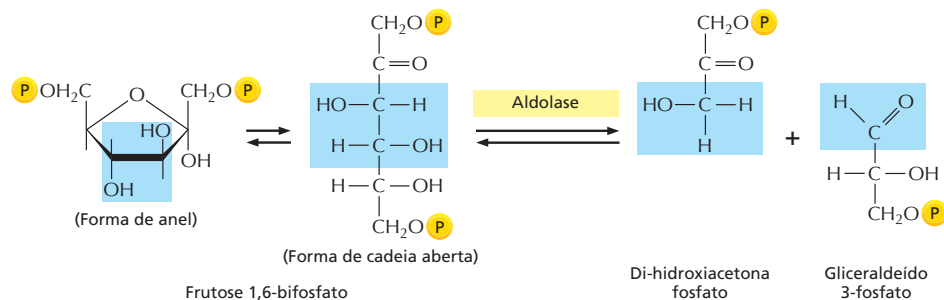
Aldolase

(Forma de anel)

(Forma de cadeia aberta)

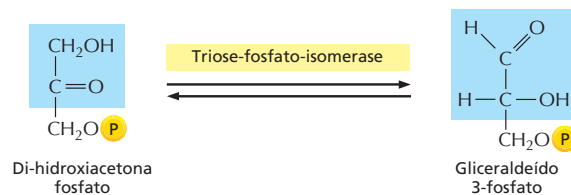
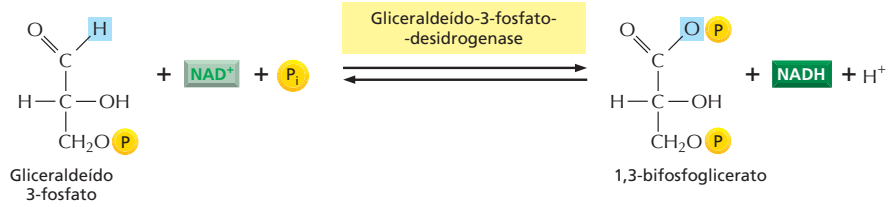
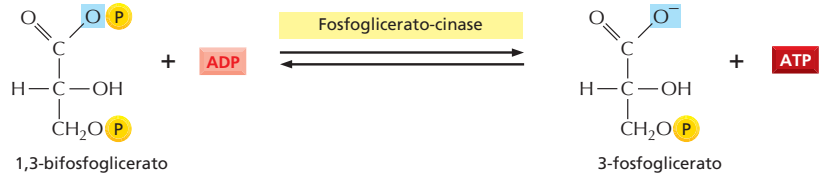
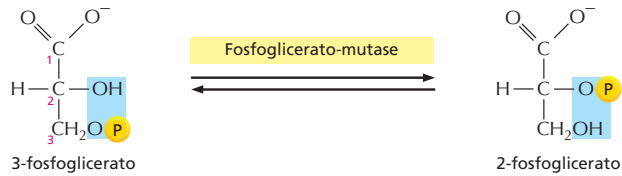
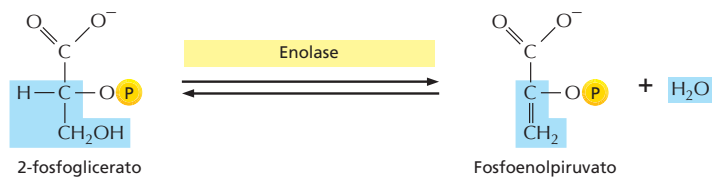
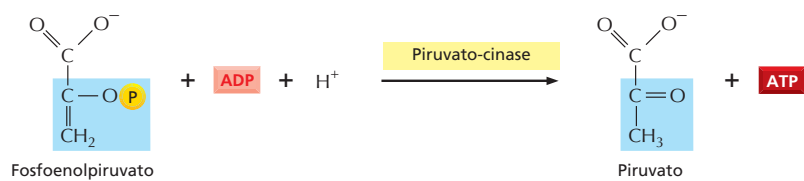
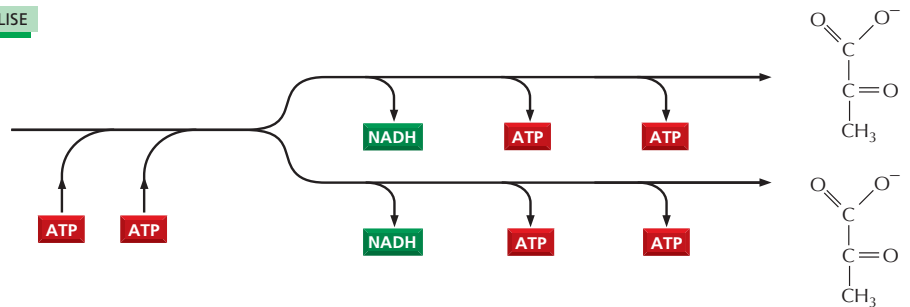
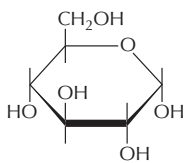
Frutose 1,6-bifosfato

Di-hidroxiacetona fosfato

Gliceraldeído 3-fosfato

Etapa 5 O outro produto da etapa 4, di-hidroxiacetona fosfato, é isomerizado para formar gliceraldeído 3-fosfato.

Triose-fosfato-isomerase

Di-hidroxiacetona fosfato

Gliceraldeído 3-fosfato

Etapa 6
As duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato são oxidadas. A fase geradora de energia da glicólise se inicia assim que NADH e uma nova ligação anidrido de alta energia ao fosfato são formadas (ver Figura 13-5).
Gliceraldeído 3-fosfato
NAD^+
P_i
Gliceraldeído-3-fosfato--desidrogenase
NADH
H^+
1,3-bifosfoglicerato
Etapa 7
A transferência à ADP do grupo fosfato de alta energia que foi gerado na etapa 6 forma ATP.
1,3-bifosfoglicerato
ADP
Fosfoglicerato-cinase
ATP
3-fosfoglicerato
Etapa 8
A ligação éster fosfato remanescente no 3-fosfoglicerato, a qual possui uma energia livre de hidrólise relativamente baixa, é deslocada do carbono 3 para o carbono 2 para formar 2- fosfoglicerato.
3-fosfoglicerato
Fosfoglicerato-mutase
2-fosfoglicerato
Etapa 9
A remoção de água do 2-fosfoglicerato cria uma ligação enol fosfato de alta energia.
2-fosfoglicerato
Enolase
Fosfoenolpiruvato
H_2O
Etapa 10
A transferência ao ADP do grupo fosfato de alta energia que foi gerado na etapa 9 forma ATP, completando a glicólise.
Fosfoenolpiruvato
ADP
H^+
Piruvato-cinase
ATP
Piruvato
RESULTADO LÍQUIDO DA GLICÓLISE
Glicose
ATP
ATP
NADH
ATP
ATP
NADH
ATP
ATP
Duas moléculas de piruvato
Além do piruvato, os produtos líquidos são duas moléculas de ATP e duas moléculas de NADH.

do água, e a NAD^+ formada a partir da NADH é reutilizada na glicólise (ver etapa 6 no Painel 13-1, p. 431). A montagem da via glicolítica completa, na década de 1930, foi o principal triunfo da bioquímica e logo foi seguida pelo reconhecimento do papel central do ATP nos processos celulares.

As fermentações possibilitam a produção de ATP na ausência de oxigênio

Para a maioria das células animais e vegetais, a glicólise é apenas um prelúdio para o terceiro e o último estágio da quebra de moléculas nutritivas, no qual grandes quantidades de ATP são geradas por fosforilação oxidativa na mitocôndria com o consumo de oxigênio. Entretanto, para vários microrganismos anaeróbios, os quais não utilizam O_2 e podem crescer e dividir-se em sua ausência, a glicólise é a principal fonte de ATP. Isso também se aplica para certos tecidos animais, como o músculo esquelético, que podem continuar funcionando com baixos níveis de O_2. Nessas condições anaeróbias, o piruvato e a NADH permanecem no citosol. O piruvato é convertido em produtos que são excretados pela célula: em lactato no músculo, por exemplo, ou em etanol e CO_2 nas leveduras usadas na preparação de bebidas fermentadas e de pães. Nesse processo, a NADH doa seus elétrons e é convertida novamente em NAD^+. Essa regeneração de NAD^+ é necessária para manter as reações de glicólise (**Figura 13-4**). Vias ana-

QUESTÃO 13-1

À primeira vista, as etapas finais da fermentação parecem ser reações desnecessárias: a geração de lactato ou etanol não produz qualquer energia adicional para a célula. Explique por que células crescendo na ausência de oxigênio não poderiam simplesmente descartar piruvato como produto de refugo. Que produtos derivados da glicose se acumulariam nas células incapazes de gerar ou lactato ou etanol pela fermentação?

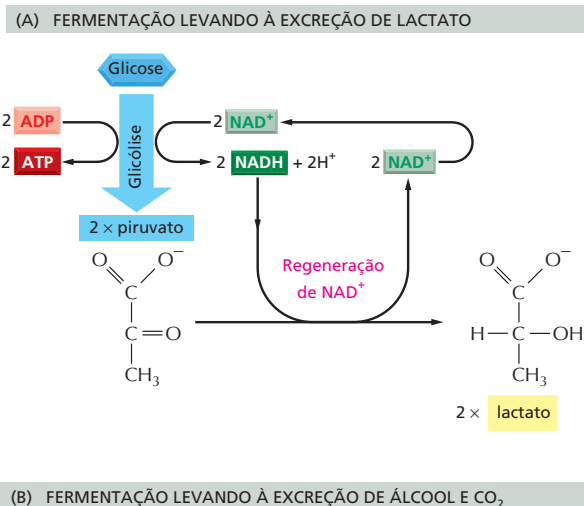



Figura 13-4 **O piruvato pode ser quebrado pela fermentação na ausência de oxigênio.** (A) Quando uma quantidade imprópria de oxigênio está presente, por exemplo, em uma célula muscular sofrendo contração vigorosa, o piruvato produzido pela glicólise é convertido em lactato, como demonstrado. Essa reação restitui a NAD^+ consumida na etapa 6 da glicólise, porém a via completa rende muito menos energia do que a oxidação completa. (B) Em alguns organismos que podem crescer anaerobiamente, como as leveduras, o piruvato é convertido via acetaldeído em dióxido de carbono e etanol. Novamente, essa via regenera NAD^+ a partir de NADH, como necessária para possibilitar a continuidade da glicólise. Tanto (A) e (B) são exemplos de fermentações.

eróbias produtoras de energia como essas são chamadas de **fermentações**. O estudo das fermentações comercialmente importantes realizadas por leveduras inspirou muito o início da bioquímica.

Muitas Bacteria e Archaea também podem gerar ATP na ausência de oxigênio por *respiração anaeróbia*, um processo que utiliza uma molécula diferente de oxigênio como aceptora final de elétrons. A respiração anaeróbia difere da fermentação, uma vez que envolve uma cadeia transportadora de elétrons embebida na membrana.

A glicólise ilustra como as enzimas acoplam a oxidação à conservação de energia

A analogia com "pá giratória" no Capítulo 3 explicou como as células obtêm energia útil a partir da oxidação de moléculas orgânicas pelo acoplamento de uma reação energeticamente desfavorável a uma energeticamente favorável (ver Figura 3-30). Para ilustrar exatamente como as enzimas – a "pá giratória" em nossa analogia – permitem que as reações acopladas ocorram, veremos mais de perto um par-chave nas reações glicolíticas.

Essas reações – etapas 6 e 7 no Painel 13-1 – convertem o açúcar de três carbonos intermediário gliceraldeído 3-fosfato (um aldeído) em 3-fosfoglicerato (um ácido carboxílico). Essa conversão acarreta a oxidação de um grupo aldeído em um grupo ácido carboxílico, o que ocorre em duas etapas. A reação total libera energia livre suficiente para converter a molécula de ADP em ATP e para transferir dois elétrons do aldeído para NAD^+ formando NADH enquanto ainda libera calor suficiente no ambiente para fazer a reação total energeticamente favorável: a ΔG^0 para a reação total é –3,0 kcal/mol (–12,5 kJ/mol).

Esse feito notável de obtenção de energia está detalhado na **Figura 13-5**. As reações químicas indicadas são precisamente guiadas por duas enzimas às quais os açúcares intermediários estão firmemente ligados. De fato, como detalhado na Figura 13-5, a primeira enzima (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) forma uma ligação covalente de curta duração com o aldeído por meio de um grupo –SH reativo na enzima e catalisa sua oxidação nesse estado vinculado. A ligação reativa enzima-substrato é então substituída por um íon fosfato inorgânico para produzir um fosfato intermediário de alta energia, o qual é liberado da enzima. Esse intermediário, 1,3-bifosfoglicerato, liga-se à segunda enzima (fosfoglicerato-cinase). Essa enzima então catalisa a transferência energeticamente favorável do fosfato de alta energia intermediário para o ADP, formando ATP e completando o processo de oxidação de um aldeído a um ácido carboxílico.

Discutimos esse processo de oxidação em particular em detalhes porque ele fornece um exemplo claro de estocagem de energia mediada por enzima por reações acopladas (**Figura 13-6**). Essas reações (etapas 6 e 7) são as únicas na glicólise que criam ligações fosfato de alta energia diretamente a partir de fosfato inorgânico. Como tais, elas contam para a produção líquida de duas moléculas de ATP e duas moléculas de NADH por molécula de glicose. Como mencionamos, essa NADH deve ser reoxidada à NAD^+ necessária para essas reações acopladas. Se NAD^+ não estiver disponível, a glicólise parará (ver Figura 13-4).

Como vimos recentemente, o ATP pode ser formado prontamente a partir de ADP quando intermediários das reações são formados com ligações fosfato de energia mais alta do que aquelas em ATP. A energia das ligações fosfato pode ser ordenada pela determinação da variação-padrão de energia livre (ΔG^o) para a quebra de cada ligação por hidrólise; a **Figura 13-7** compara as ligações anidrido-fosfóricas de alta energia no ATP com algumas outras ligações fosfato que são geradas durante a glicólise. Como explicado no Painel 3-1 (p. 95), descrevemos ligações como de "alta energia" apenas no sentido de que sua hidrólise é, em particular, favorável energeticamente.

QUESTÃO 13-2

O arseniato (AsO_4^{3-}) é quimicamente muito semelhante ao fosfato (PO_4^{3-}) e é utilizado como um substrato alternativo por muitas enzimas que requerem fosfato. Ao contrário do fosfato, entretanto, uma ligação anidrídica entre o arseniato e o carbono é muito rapidamente hidrolisada em água. Sabendo disso, sugira por que o arseniato é um composto escolhido por assassinos, mas não pelas células. Formule sua explicação no contexto da Figura 13-6.

Figura 13-5 A energia é armazenada nas etapas 6 e 7 da glicólise. Nessas etapas, a oxidação de um aldeído a um ácido carboxílico é acoplada à formação de ATP e NADH. (A) Na etapa 6, a enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase acopla a oxidação energeticamente favorável de um aldeído à formação energeticamente desfavorável de uma ligação fosfato de alta energia. Ao mesmo tempo, permite que energia seja armazenada em NADH. A formação de uma ligação fosfato de alta energia é dirigida pela reação de oxidação, e dessa forma a enzima atua como acoplador em forma de "pá giratória" da Figura 3-30B. Na etapa 7 da reação, a ligação fosfato de alta energia recém-formada em 1,3-bifosfoglicerato é transferida para ADP, formando uma molécula de ATP e deixando um grupo carboxílico ácido livre no açúcar oxidado. Essa reação é catalisada pela enzima fosfoglicerato-cinase. Observe que a porção da molécula de gliceraldeído 3-fosfato na caixa sombreada (*cinza*) permanece inalterada por todas essas reações. (B) Resumo da alteração química geral produzida pelas reações 6 e 7.

(A) ETAPAS 6 E 7 DA GLICÓLISE

Gliceraldeído 3-fosfato

ETAPA 6 — Gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase

ENZIMA —SH

NAD^+

Uma ligação covalente é formada entre gliceraldeído 3-fosfato (o substrato) e o grupo –SH de uma cadeia lateral de cisteína da enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase. A enzima também se liga não covalentemente à NAD^+.

NADH + H^+

Ligação de alta energia (tioéster)

A oxidação do gliceraldeído 3-fosfato ocorre quando dois elétrons mais um átomo de hidrogênio (um íon hidreto; ver Figura 3-34) são transferidos do gliceraldeído 3-fosfato à NAD^+ ligada, formando NADH. Parte da energia liberada pela oxidação do aldeído é então armazenada na NADH, e parte vai na conversão da ligação entre a enzima e o gliceraldeído 3-fosfato em uma ligação tioéster de alta energia.

Fosfato

Uma molécula de fosfato inorgânico desloca a ligação de alta energia para a enzima para criar 1,3-difosfoglicerato, que contém uma ligação fosfato de alta energia.

1,3-bifosfoglicerato

ETAPA 7 — Fosfoglicerato-cinase

ADENINA RIBOSE ADP

ADENINA RIBOSE ATP

3-fosfoglicerato

A ligação de alta energia ao fosfato é transferida para ADP para formar ATP.

(B)

Grande parte da energia de oxidação foi armazenada nos carreadores ativados de ATP e NADH.

Figura 13-6 O acoplamento das reações nas etapas 6 e 7 da glicólise permitem a formação da ligação fosfato de alta energia, energeticamente desfavorável. Na etapa 6, a energia de oxidação da ligação C-H conduz à formação de NADH e de uma ligação fosfato de alta energia. A quebra da ligação de alta energia na etapa 7 conduz então à formação de ATP.

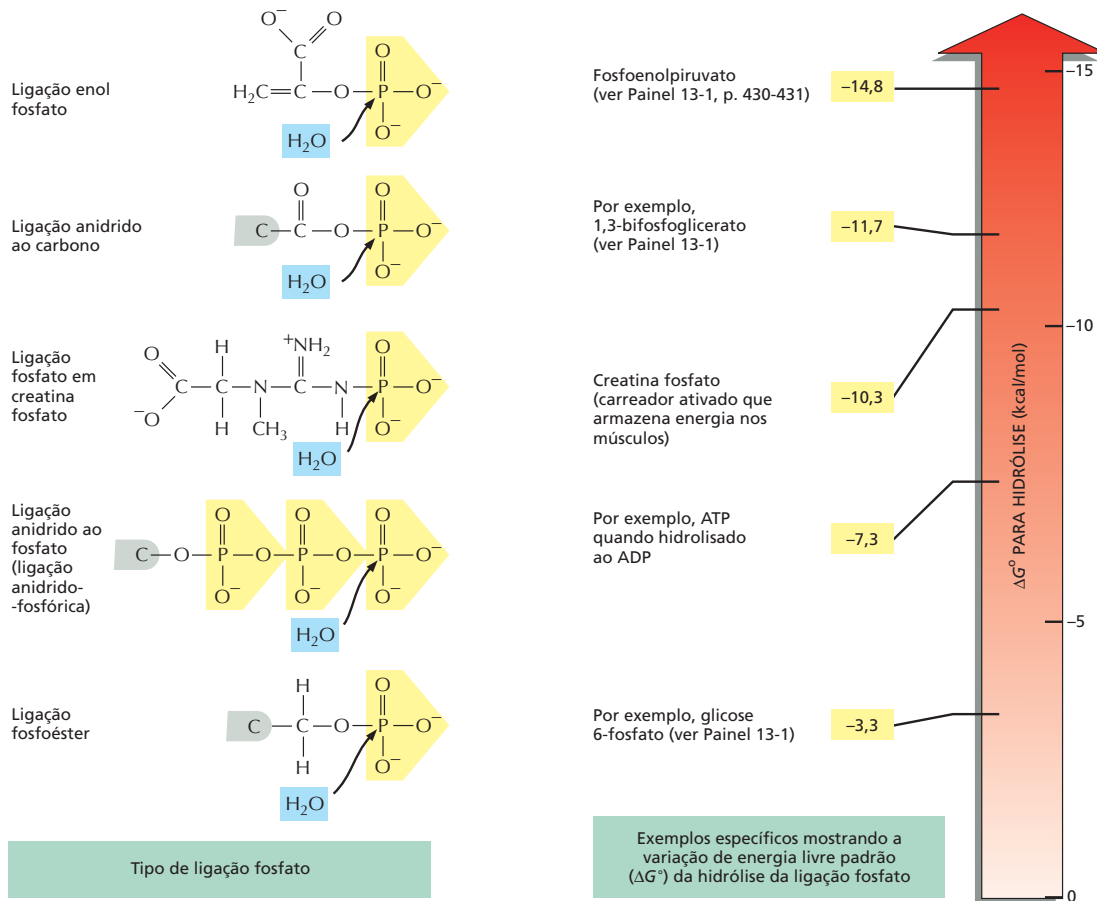



Figura 13-7 Diferenças nas energias de diferentes ligações fosfato permitem a formação de ATP em nível de fosforilação de substrato. Exemplos dos diferentes tipos de ligações fosfato e dos sítios de hidrólise são mostrados nas moléculas representadas à esquerda. Aquelas começando por um átomo de carbono *cinza* mostram apenas parte da molécula. Exemplos de moléculas contendo tais ligações são dados à direita, com a variação da energia livre para hidrólise em kcal/mol (1 kcal = 4,184 kJ). A transferência de um grupo fosfato de uma molécula à outra é energeticamente favorável se a variação de energia livre padrão ($\Delta G°$) da hidrólise da ligação fosfato da primeira molécula é mais negativa do que da hidrólise da ligação fosfato (uma vez presente) na segunda. Dessa forma, um grupo fosfato é prontamente transferido de 1,3-difosfoglicerato para ADP para formar ATP. A reação de hidrólise pode ser vista como a transferência de um grupo fosfato para a água.

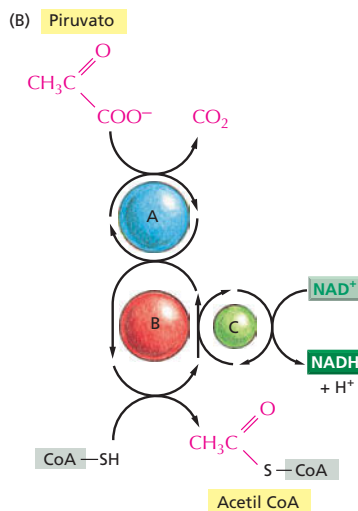
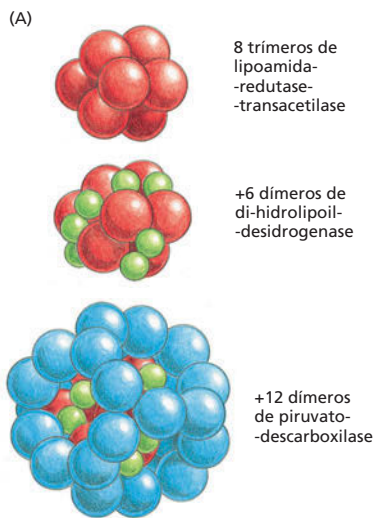



Figura 13-8 O piruvato é oxidado em acetil-CoA e CO_2 pela piruvato-desidrogenase. (A) Estrutura geral do complexo piruvato-desidrogenase, o qual contém três diferentes enzimas e cerca de 60 cadeias polipeptídicas. Nesse grande complexo multienzimático, os intermediários da reação são passados diretamente de uma enzima à outra. (B) As reações realizadas pelo complexo piruvato-desidrogenase. O complexo converte piruvato a acetil-CoA na matriz mitocondrial; a NADH é também produzida nessa reação. A, B e C são as três enzimas, *piruvato-descarboxilase, lipoamida-redutase-transacetilase* e *di-hidrolipol-desidrogenase*, respectivamente, como ilustrado em (A); suas atividades são ligadas como demonstrado. Piruvato e seus produtos são mostrados em *vermelho*.

Os açúcares e as gorduras são degradados em acetil-CoA nas mitocôndrias

No metabolismo aeróbio de células eucarióticas, o piruvato produzido pela glicólise é bombeado ativamente para dentro da matriz mitocondrial, o principal compartimento interno dessa organela (ver Figura 14-12). Lá ele é rapidamente descarboxilado por um complexo gigante de três enzimas, chamado de *complexo piruvato-desidrogenase*. Os produtos da descarboxilação do piruvato são uma molécula de CO_2 (um produto de refugo), uma molécula de NADH e acetil-CoA. A estrutura e a função da piruvato-desidrogenase estão resumidas na **Figura 13-8**.

Os ácidos graxos, derivados das **gorduras**, são um combustível alternativo para os açúcares para geração de energia. Assim como o piruvato derivado da glicólise, os ácidos graxos são convertidos em acetil-CoA na mitocôndria. Cada molécula longa de ácido graxo (na forma da molécula ativada, acil-CoA graxo) é quebrada completamente por um ciclo de reações que poda dois carbonos de cada vez de sua extremidade carboxílica, gerando uma molécula de acetil-CoA em cada volta do ciclo. Uma molécula de NADH e uma molécula de outro carreador de elétrons, $FADH_2$, também são produzidas nesse processo (**Figura 13-9**).

Açúcares e gorduras constituem as principais fontes de energia para a maioria dos organismos não fotossintetizantes, incluindo humanos. No curso do seu processamento em acetil-CoA, apenas uma pequena parte da energia útil armazenada nesses alimentos é extraída e convertida em ATP ou NADH. A maior parte da energia permanece armazenada em acetil-CoA. O próximo estágio na respiração, no qual o grupo acetila da acetil-CoA é oxidado a CO_2 e H_2O no ciclo do ácido cítrico, é, portanto, central para o metabolismo de energia dos organismos aeróbios. Nos eucariotos, o ciclo do ácido cítrico ocorre nas mitocôndrias, as organelas para as quais o piruvato e os ácidos graxos são direcionados para a produção de acetil-CoA (**Figura 13-10**).

Além do piruvato e ácidos graxos, alguns aminoácidos são transportados do citosol para dentro das mitocôndrias, onde também são convertidos em acetil-CoA ou um dos intermediários do ciclo do ácido cítrico (ver Figura 13-2). Assim, na célula eucariótica, a mitocôndria é o local central para o qual todos os processos geradores de energia conduzem, independentemente de iniciarem com açúcares, gorduras ou proteínas. Nas bactérias aeróbias, que não possuem mitocôndrias, todas essas reações – glicólise, produção de acetil-CoA e ciclo do ácido cítrico – ocorrem no único compartimento do citosol.

QUESTÃO 13-3

Muitas reações catabólicas e anabólicas se baseiam em reações similares, mas que ocorrem em direções opostas, como a hidrólise e as reações de condensação descritas na Figura 3-38. Isso é verdade para a quebra e a síntese de ácidos graxos. A partir do que você sabe sobre o mecanismo de quebra de ácidos graxos resumido na Figura 13-9, você esperaria que os ácidos graxos mais comumente encontrados nas células tenham um número ímpar ou par de átomos de carbono?

O ciclo do ácido cítrico gera NADH pela oxidação de grupos acetila a CO_2

O terceiro e último estágio na quebra oxidativa de moléculas de alimento para gerar energia requer O_2 abundante. Embora organismos vivos tenham habitado a Terra há 3,5 bilhões de anos, acredita-se que o planeta tenha desenvolvido uma atmosfera contendo O_2 apenas há 1 ou 2 bilhões de anos (ver Figura

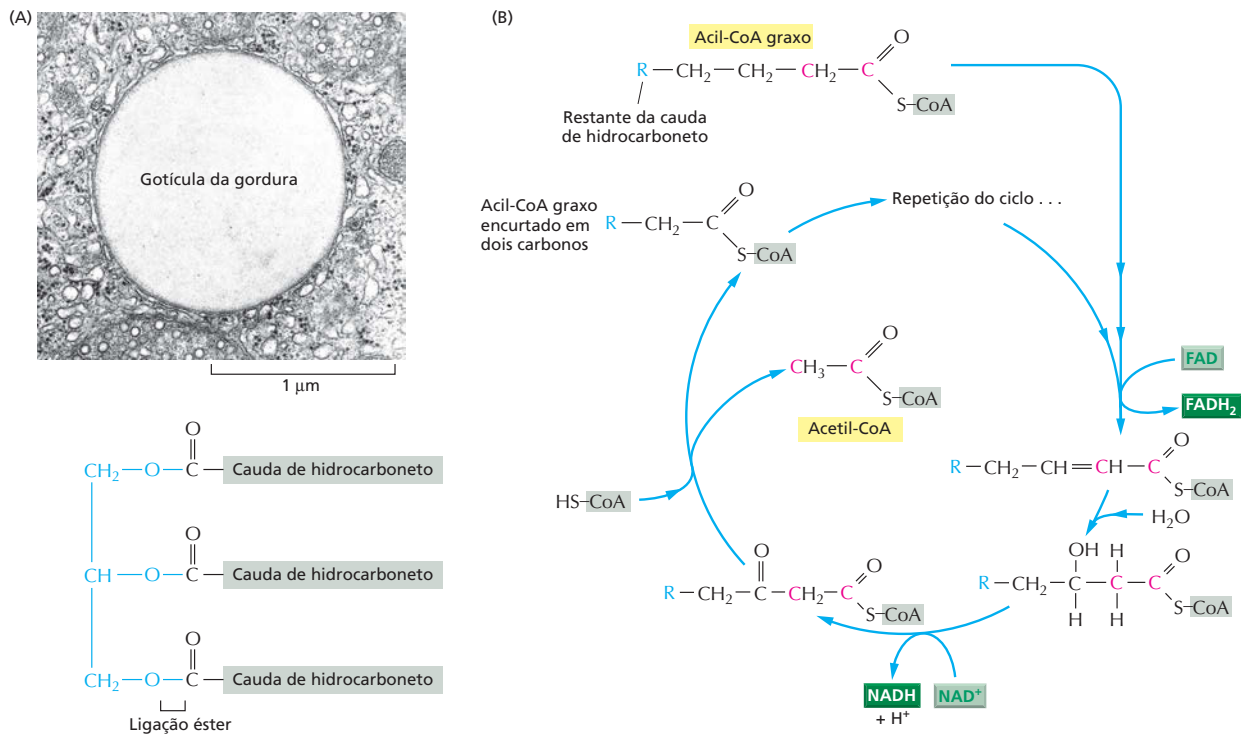



Figura 13-9 Os ácidos graxos também são oxidados a acetil-CoA. (A) Microfotografia eletrônica de uma gotícula de gordura no citoplasma *(parte superior)*, e a estrutura das gorduras *(parte inferior)*. As gorduras são triacilgliceróis. A porção glicerol, na qual três ácidos graxos estão ligados por ligações éster, é mostrada aqui em *azul*. As gorduras são insolúveis em água e formam grandes gotículas nas células adiposas especializadas (chamadas de adipócitos), nas quais elas são armazenadas. (B) O ciclo de oxidação de ácidos graxos. O ciclo é catalisado por uma série de quatro enzimas na mitocôndria. Cada volta do ciclo encurta a cadeia do ácido graxo em dois carbonos (mostrado em *vermelho*) e gera uma molécula de acetil-CoA e uma molécula de NADH e de $FADH_2$. (A, cortesia de Daniel S. Friend.)

14-43). Portanto, as reações que consomem O_2 que discutiremos a seguir provavelmente são de origem recente. Em contrapartida, o mecanismo utilizado para produzir ATP na Figura 13-5 não requer oxigênio, e análogos daquele elegante par de reações acopladas poderiam ter surgido muito cedo na história da vida na Terra.

No século XIX, os biólogos perceberam que, na ausência de ar (condições anaeróbias), as células produzem ácido láctico (no músculo, por exemplo) ou etanol (em leveduras, por exemplo), e, na presença de ar (condições aeróbias), as células consomem O_2 e produzem CO_2 e H_2O. Os intensos esforços para

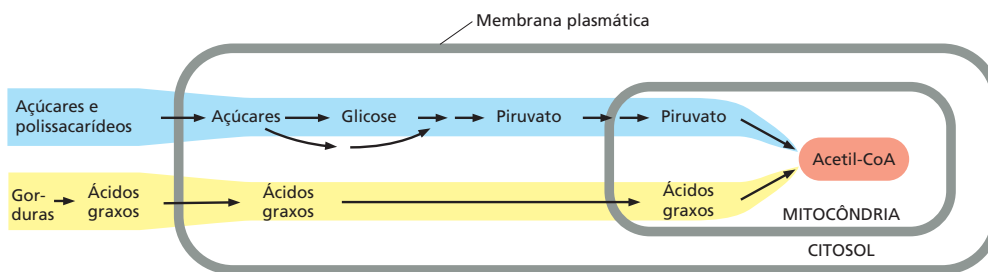



Figura 13-10 Nas células eucarióticas, a acetil-CoA é produzida nas mitocôndrias a partir de moléculas derivadas de açúcares e gorduras. A maioria das reações de oxidação da célula ocorre nessas organelas, e a maioria do ATP é produzida aí.

definir as vias do metabolismo aeróbio finalmente enfocaram a oxidação do piruvato e levaram, em 1937, à descoberta do **ciclo do ácido cítrico**, também conhecido como o *ciclo do ácido tricarboxílico* ou o *ciclo de Krebs* (ver **Como Sabemos**, p. 440-441). O ciclo do ácido cítrico é responsável por cerca de dois terços da oxidação total de compostos de carbono na maioria das células, e seus principais produtos finais são CO_2 e elétrons de alta energia na forma de NADH. O CO_2 é liberado como produto de refugo, e os elétrons de alta energia da NADH são passados para uma série de enzimas ligadas à membrana coletivamente conhecidas como *cadeia transportadora de elétrons*. No final da cadeia, esses elétrons se combinam com O_2 para produzir H_2O. Embora o ciclo do ácido cítrico propriamente dito não utilize O_2, ele requer O_2 para proceder, pois a cadeia transportadora de elétrons permite que NADH se livre dos seus elétrons e, dessa forma, regenere a NAD^+ necessária para manter o ciclo em andamento.

O ciclo do ácido cítrico, o qual ocorre dentro da matriz mitocondrial, catalisa a oxidação completa dos átomos de carbono do grupo acetila em acetil-CoA, convertendo-os em CO_2. Contudo, o grupo acetila não é oxidado diretamente. Ao contrário, ele é transferido da acetil-CoA a uma molécula maior de quatro carbonos, *oxaloacetato*, para formar um ácido tricarboxílico de seis carbonos, o *ácido cítrico*, que dá nome ao ciclo subsequente de reações. Essa molécula de ácido cítrico é então gradualmente oxidada, e a energia dessa oxidação é aproveitada para produzir moléculas carreadoras de alta energia, de uma forma muito semelhante à que foi descrita para a glicólise. A cadeia de oito reações forma um ciclo, porque o oxaloacetato que inicia o processo é regenerado no final, como representado resumidamente na **Figura 13-11**.

Discutimos até agora apenas um dos três tipos de moléculas carreadoras que são produzidas pelo ciclo do ácido cítrico – NADH. No entanto, em adição às três moléculas de NADH, cada volta do ciclo também produz uma molécula de **$FADH_2$** (flavina adenina dinucleotídeo reduzida) a partir de FAD e uma molécula do ribonucleotídeo **GTP** (trifosfato de guanosina) a partir de GDP (ver Figura 13-11). A estrutura dessas duas moléculas carreadoras ativadas está ilustrada na **Figura 13-12**. O GTP é um parente próximo do ATP, e a transferência de seu grupo fosfato terminal ao ADP produz uma molécula de ATP em cada

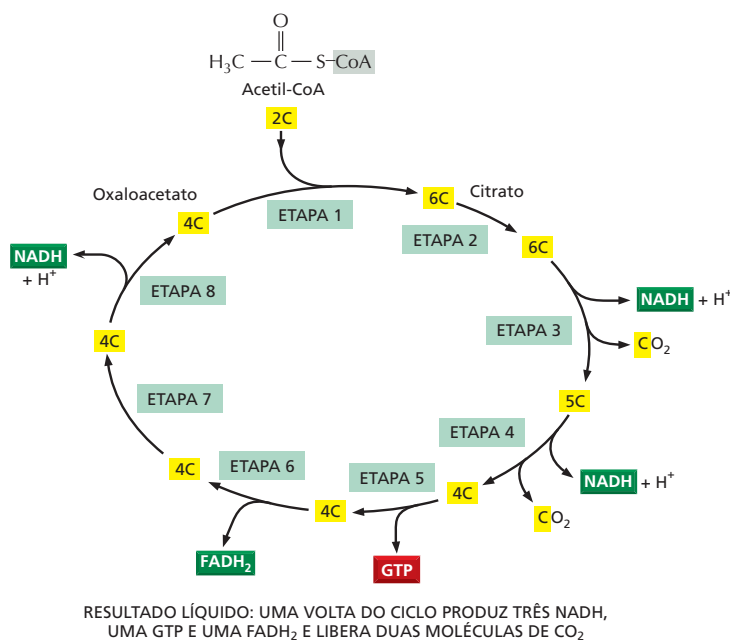



Figura 13-11 O ciclo do ácido cítrico catalisa a oxidação completa dos átomos de carbono da acetil-CoA. A reação da acetil-CoA com oxaloacetato começa o ciclo com a produção de citrato (ácido cítrico). Cada volta do ciclo produz duas moléculas de CO_2 (como produtos de refugo), três moléculas de NADH, uma molécula de GTP e uma molécula de $FADH_2$. O número de átomos de carbono em cada intermediário é mostrado em uma *caixa amarela*. (ver também Painel 13- 2, p. 442-443.) Todas as etapas do ciclo do ácido cítrico são revisadas na **Animação 13.2**.

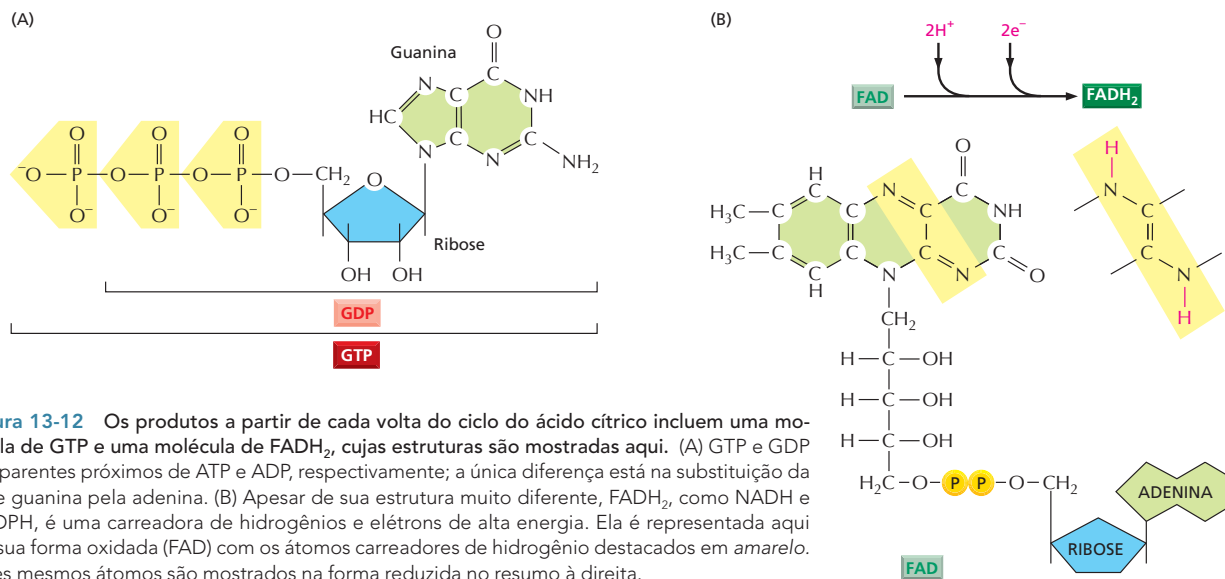



Figura 13-12 Os produtos a partir de cada volta do ciclo do ácido cítrico incluem uma molécula de GTP e uma molécula de $FADH_2$, cujas estruturas são mostradas aqui. (A) GTP e GDP são parentes próximos de ATP e ADP, respectivamente; a única diferença está na substituição da base guanina pela adenina. (B) Apesar de sua estrutura muito diferente, $FADH_2$, como NADH e NADPH, é uma carreadora de hidrogênios e elétrons de alta energia. Ela é representada aqui em sua forma oxidada (FAD) com os átomos carreadores de hidrogênio destacados em *amarelo*. Esses mesmos átomos são mostrados na forma reduzida no resumo à direita.

ciclo. Como a NADH, a $FADH_2$ é uma carreadora de elétrons de alta energia e de hidrogênio. Como discutimos brevemente, a energia que é armazenada nos elétrons de alta energia prontamente transferíveis de NADH e $FADH_2$ será subsequentemente utilizada para produzir ATP pelo processo de *fosforilação oxidativa*, que ocorre na membrana mitocondrial. A fosforilação oxidativa é a única etapa no catabolismo oxidativo do alimento que requer diretamente O_2 a partir da atmosfera.

O ciclo do ácido cítrico completo está apresentado no **Painel 13-2** (p. 442- 443). Observe que os átomos de oxigênio necessários para produzir CO_2 a partir dos grupos acetila entrando no ciclo do ácido cítrico são supridos não por O_2, mas por água. Como ilustrado no painel, três moléculas de água são rompidas em cada ciclo, e os átomos de oxigênio de algumas delas são, em última instância, utilizados para produzir CO_2. Uma concepção errada comum sobre a respiração aeróbia é que o O_2 necessário para o processo é convertido em CO_2, que é liberado como produto de refugo, não incorporado diretamente em CO_2.

Muitas vias biossintéticas são iniciadas com a glicólise ou com o ciclo do ácido cítrico

As reações catabólicas, como as da glicólise e do ciclo do ácido cítrico, produzem tanto energia para a célula como para os precursores a partir dos quais muitas outras moléculas da célula são construídas (ver Figura 3-2). Até aqui enfatizamos mais a produção de energia do que a provisão de materiais iniciais para a biossíntese. Entretanto, muitos dos intermediários formados na glicólise e no ciclo do ácido cítrico são desviados para outras vias biossintéticas, ou *anabólicas*, onde são convertidos por uma série de reações catalisadas por enzimas em aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos e outras moléculas orgânicas pequenas de que a célula necessita. O oxaloacetato e α-cetoglutarato do ciclo do ácido cítrico, por exemplo, são transferidos da mitocôndria de volta para o citosol, onde servem como precursores para muitas moléculas essenciais, como os aminoácidos aspartato e glutamato, respectivamente. Uma ideia da complexidade desse processo pode ser obtida da **Figura 13-17**, a qual ilustra algumas das ramificações das reações catabólicas centrais que levam à biossíntese.

COMO SABEMOS:
DESVENDANDO O CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO

"Eu sou frequentemente questionado sobre como o trabalho sobre o ciclo do ácido cítrico surgiu e se desenvolveu", afirma o bioquímico Hans Krebs em uma conferência e artigo de revisão no qual ele descreve a descoberta vencedora do Prêmio Nobel do ciclo de reações que se situa no centro do metabolismo celular. O conceito se originou de uma inspiração repentina, uma visão reveladora? "Não foi nada disso", respondeu Krebs. Ao contrário, sua percepção de que essas reações ocorrem em um ciclo – em vez de um conjunto de vias lineares – surgiu de um "processo evolutivo muito lento" que ocorreu no decorrer de um período de cinco anos, durante o qual Krebs acoplou percepção e raciocínio à experimentação cuidadosa para descobrir uma das vias centrais que baseiam o metabolismo de energia das células.

Tecido moído, catálise curiosa

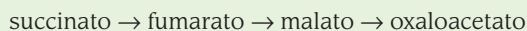
No começo da década de 1930, Krebs e outros investigadores descobriram que um conjunto seleto de moléculas é oxidado rapidamente em várias preparações de tecidos – fatias de rim ou fígado, ou suspensões de músculo de pombo moído. Uma vez que essas reações dependem da presença de oxigênio, os pesquisadores suspeitaram que esses conjuntos de compostos poderiam incluir intermediários importantes na respiração celular – o consumo de O_2 e a produção de CO_2 que acompanham o metabolismo de gêneros alimentícios.

Usando as preparações de tecido moído, Krebs e colaboradores fizeram as seguintes observações. Primeiro, que na presença de oxigênio, certos ácidos orgânicos – citrato, succinato, fumarato e malato – são prontamente oxidados a dióxido de carbono. Essas reações dependem de um suprimento constante de oxigênio.

Segundo, que a oxidação desses compostos recai em um par de vias sequenciais e lineares:

citrato → α-cetoglutarato → succinato

e

succinato → fumarato → malato → oxaloacetato

Terceiro, que pequenas quantidades de vários desses compostos, quando adicionadas às suspensões de músculo moído, estimulavam uma captura surpreendentemente grande de oxigênio – muito maior do que a necessária para oxidar apenas as moléculas adicionadas. Para explicar essa surpreendente observação catalítica, Albert Szent-Györgyi (o Nobelista que resolveu a segunda via acima) sugeriu que uma única molécula de cada composto deveria de alguma forma agir cataliticamente para estimular a oxidação de muitas moléculas de alguma substância endógena do músculo.

Nesse ponto, a maior parte das reações centrais do ciclo do ácido cítrico era conhecida. O que ainda não era claro – e causava grande confusão, mesmo para futuros laureados com o prêmio Nobel – é como essas reações aparentemente lineares poderiam conduzir um tal consumo catalítico de oxigênio, onde cada molécula de metabólito abastece a oxidação de muitas outras moléculas. Para simplificar a discussão sobre como Krebs finalmente resolveu esse quebra-cabeça – pela ligação dessas reações lineares juntas em um ciclo –, iremos agora nos referir às moléculas envolvidas por uma sequência de letras, de A até H (**Figura 13-13**).

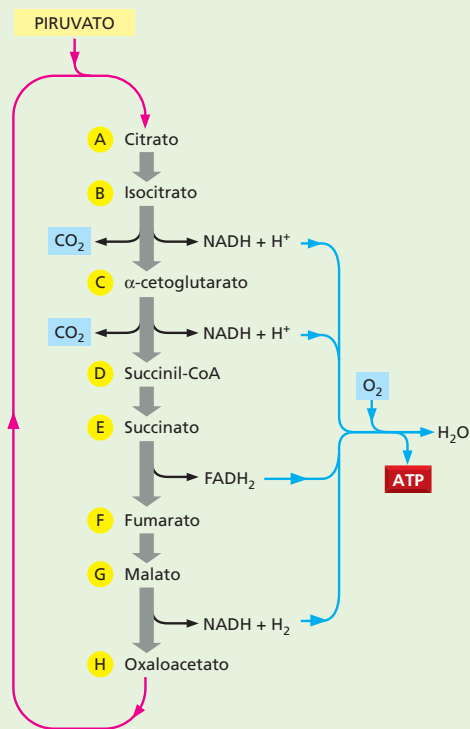



Figura 13-13 **Nessa representação simplificada do ciclo do ácido cítrico, O_2 é consumido, e CO_2 é liberado, conforme os intermediários moleculares se tornam oxidados.** Krebs e colegas não perceberam inicialmente que essas reações de oxidação ocorrem em um ciclo, como mostrado aqui.

Um veneno sugere um ciclo

Muitos dos indícios que Krebs utilizou para formular o ciclo do ácido cítrico vieram de experimentos com malonato – um composto venenoso que inibe especificamente a enzima succinato-desidrogenase, que converte E em F. Malonato se assemelha muito a succinato (E) em sua estrutura (**Figura 13-14**) e serve como inibidor competitivo da enzima. Como a adição de malonato envenena a respiração nos tecidos, Krebs concluiu que a succinato-desidrogenase (e a via inteira ligada a ela) deveria desempenhar um papel crucial na respiração celular.

Malonato	Succinato
COO^-	COO^-
CH_2	CH_2
COO^-	CH_2
	COO^-

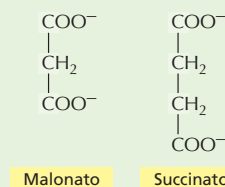



Figura 13-14 A estrutura do malonato se assemelha muito àquela do succinato.

Krebs então descobriu que, quando A, B ou C eram adicionados a suspensões de tecidos envenenados com malato, E se acumulava (**Figura 13-15A**). Essa observação reforça a importância da succinato-desidrogenase para o sucesso da respiração. Entretanto, ele verificou que E também se acumulava quando F, G ou H eram adicionados a músculos envenenados com malato (Figura 13-15B). O último resultado sugere a existência de um conjunto adicional de reações que podem converter moléculas de F, G e H em E, uma vez que havia sido previamente demonstrado que E era um precursor de F, G e H, em vez de um produto de suas reações.

Quase ao mesmo tempo, Krebs também determinou que, quando as suspensões de músculo são incubadas com piruvato e oxaloacetato, o citrato se forma:

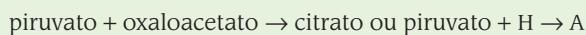
piruvato + oxaloacetato → citrato ou piruvato + H → A

Essa observação levou Krebs a postular que, quando o oxigênio está presente, piruvato e H se condensam para formar A, convertendo o previamente delineado fio de reações lineares em uma sequência cíclica (ver Figura 13-13). A descoberta de que a acetil-CoA age como um intermediário entre piruvato e oxaloacetato nessa reação, entretanto, só ocorreu após outra década.

Figura 13-15 **O envenenamento de preparações de músculo com malonato proporcionou indícios da natureza cíclica dessas reações oxidativas.** (A) A adição de A, B ou C a músculos envenenados por malonato ocasiona um acúmulo de E. (B) A adição de F, G ou H a preparações envenenadas por malonato também ocasiona um acúmulo de E, sugerindo que essas reações enzimáticas podem converter essas moléculas em E. A descoberta de que o citrato (A) pode ser formado a partir de oxaloacetato (H) e piruvato permitiu que Krebs juntasse essas duas vias de reações em um círculo completo.

Explicando os efeitos misteriosos estimulantes

O ciclo de reações que foi proposto por Krebs claramente explica como a adição de pequenas quantidades de qualquer um dos intermediários de A até H poderia causar o grande aumento na captação de O_2 que havia sido observada. O piruvato é uma substância abundante em tecidos moídos e pode ser prontamente produzido pela glicólise a partir da glicose que pode ser gerada a partir do suprimento de glicogênio (ver Figura 13-3). Sua oxidação requer um ciclo do ácido cítrico funcional, no qual cada volta do ciclo resulta na oxidação de uma molécula de piruvato. Se os intermediários A até H estão em um suprimento pequeno o suficiente, a taxa pela qual o ciclo inteiro gira será restrita. A adição de qualquer um desses intermediários terá então um efeito dramático na taxa pela qual o ciclo do ácido cítrico inteiro opera (**Figura 13-16**). Dessa forma, é fácil perceber como um grande número de moléculas de piruvato pode ser oxidado e uma grande quantidade de oxigênio consumida, para cada molécula de intermediário do ciclo do ácido cítrico que é adicionada.

Krebs continuou a demonstrar que todas as reações enzimáticas individuais em seu postulado ciclo ocorrem nas preparações de tecido. Além disso, elas ocorrem a taxas altas o suficiente para responder pela taxa de consumo de piruvato e de oxigênio nesses tecidos. Krebs, portanto, concluiu que essa série de reações é a principal, senão a única, via de oxidação do piruvato – ao menos no músculo. Compondo essas peças de informação como em um quebra-cabeça e investigando as ligações que faltavam, Krebs chegou a um quadro coerente dos processos metabólicos que fazem a base da oxidação dos alimentos. Notavelmente, ele descobriu essa intricada via metabólica sem o auxílio de reagentes nem técnicas consideradas essenciais pelos bioquímicos modernos: marcadores radioativos que possibilitam traçar compostos marcados por essas vias de reações – ou espectrometria de massa, um método potente para a rápida identificação de vários intermediários químicos que ocorrem ao longo da via.

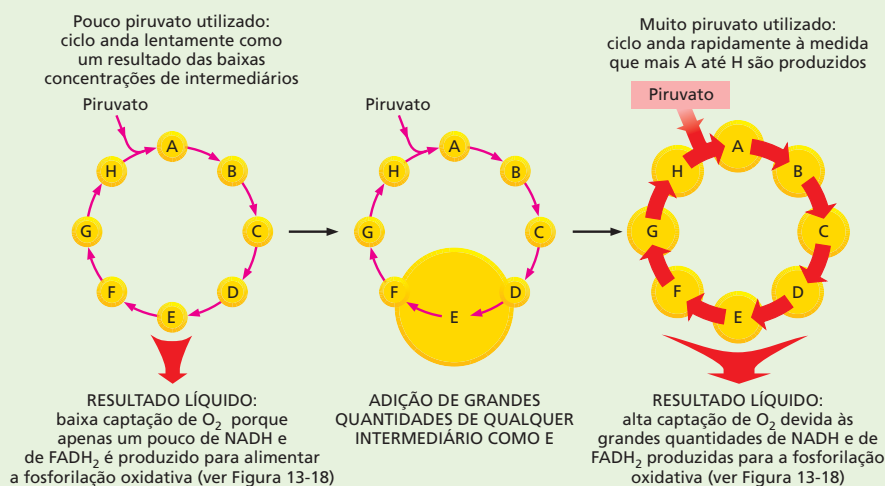



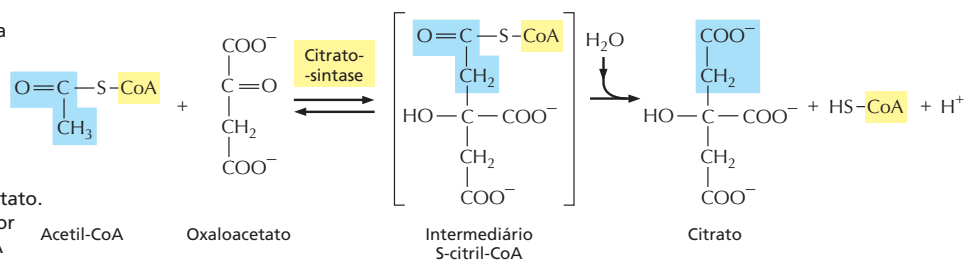
Figura 13-16 O reabastecimento do suprimento de um único intermediário qualquer tem um efeito dramático na taxa pela qual o ciclo do ácido cítrico opera como um todo.

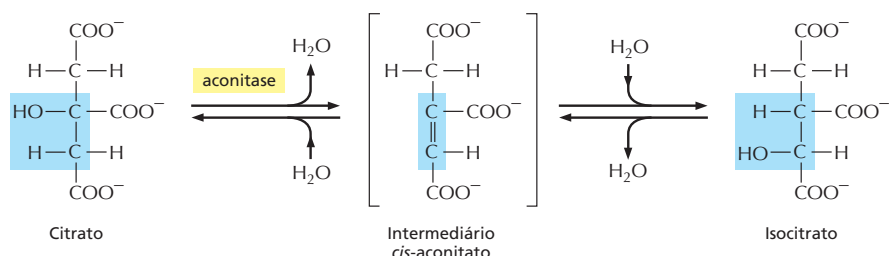
PAINEL 13-2 O ciclo do ácido cítrico completo

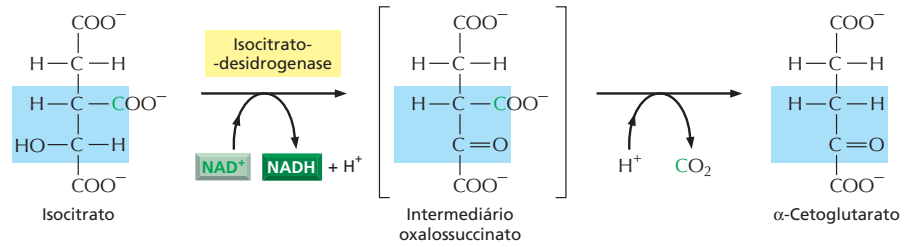
O ciclo do ácido cítrico completo. Os dois carbonos de acetil-CoA que entram nessa volta do ciclo (sombreados de vermelho) serão convertidos em CO_2 nas voltas subsequentes do ciclo: são os dois carbonos sombreados de azul que são convertidos em CO_2 nesse ciclo.

Piruvato
NAD^+ → NADH + H^+
CO_2
HS–CoA
Acetil-CoA (2C)
Próximo ciclo
Oxaloacetato (4C)
Etapa 1
H_2O
HS–CoA
Citrato (6C)
Etapa 2
Isocitrato (6C)
Etapa 3
NAD^+
NADH + H^+
CO_2
α-Cetoglutarato (5C)
Etapa 4
HS–CoA
NAD^+
NADH + H^+
CO_2
Succinil-CoA (4C)
Etapa 5
H_2O
GDP + P_i
GTP
HS–CoA
Succinato (4C)
Etapa 6
FAD
$FADH_2$
Fumarato (4C)
Etapa 7
H_2O
Malato (4C)
Etapa 8
NAD^+
NADH + H^+
Oxaloacetato (4C)
CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO

Detalhes dessas oito etapas são mostrados a seguir. Nesta parte do painel, para cada etapa, a parte da molécula que sofre uma alteração é sombreada de azul, e o nome da enzima que catalisa a reação está em uma caixa amarela.
Para assistir a um vídeo das reações do ciclo do ácido cítrico, ver Animação 13.2

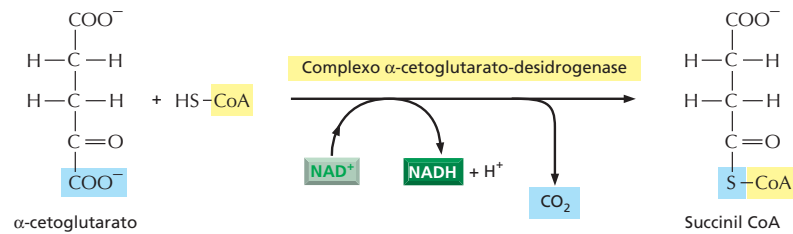
Etapa 1 Após a enzima remover um próton do grupo CH_3 da acetil-CoA, o CH_2 negativamente carregado forma uma ligação com o carbono carbonílico do oxaloacetato. A subsequente perda por hidrólise da coenzima A (CoA) impulsiona fortemente o avanço da reação.

Etapa 2 Uma reação de isomerização, na qual a água é primeiramente removida e então adicionada novamente, desloca o grupo hidroxila de um átomo de carbono para o seu vizinho.

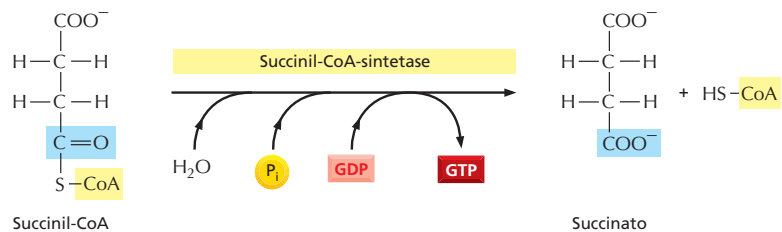
aconitase
H_2O
H_2O
Citrato
Intermediário *cis*-aconitato
Isocitrato

Etapa 3

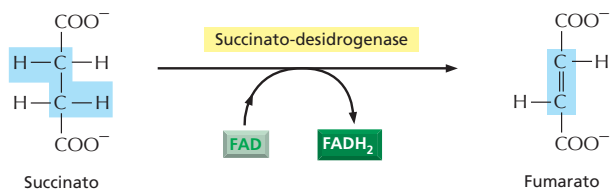
Na primeira de quatro etapas de oxidação do ciclo, o carbono, carregando o grupo hidroxila, é convertido a um grupo carbonila. O produto intermediário é instável, perdendo CO_2 enquanto ainda está ligado à enzima.

Etapa 4

O complexo *α-cetoglutarato-desidrogenase* se assemelha muito ao grande complexo enzimático que converte piruvato em acetil-CoA (*piruvato-desidrogenase*). Ele igualmente catalisa uma oxidação que produz NADH, CO_2 e uma ligação tioéster à coenzima A (CoA) de alta energia.

Complexo α-cetoglutarato-desidrogenase

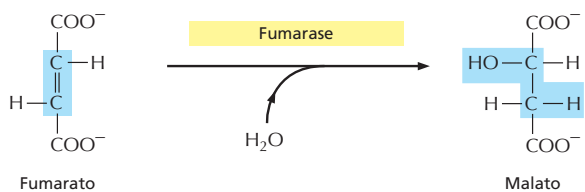
α-cetoglutarato + HS–CoA → Succinil CoA + CO_2 (NAD+ → NADH + H^+)

Etapa 5

Uma molécula de fosfato da solução desaloja a CoA, formando uma ligação fosfato a succinato de alta energia. Esse fosfato é então passado a GDP para formar GTP. (Em bactérias e plantas, o ATP é formado no lugar do GTP.)

Etapa 6

Na terceira etapa de oxidação do ciclo, a FAD remove dois átomos de hidrogênio do succinato.

Etapa 7

A adição de água ao fumarato coloca um grupo hidroxila próximo ao carbono carbonila.

Fumarase

Fumarato + H_2O → Malato

Etapa 8

Na última das quatro etapas de oxidação do ciclo, o carbono carregando o grupo hidroxila é convertido em um grupo carbonila, regenerando o oxaloacetato necessário para a etapa 1.

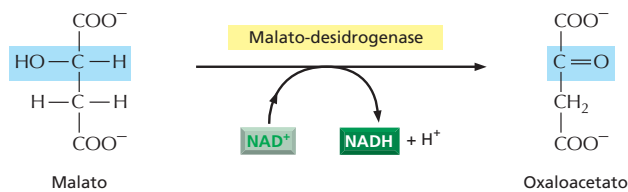
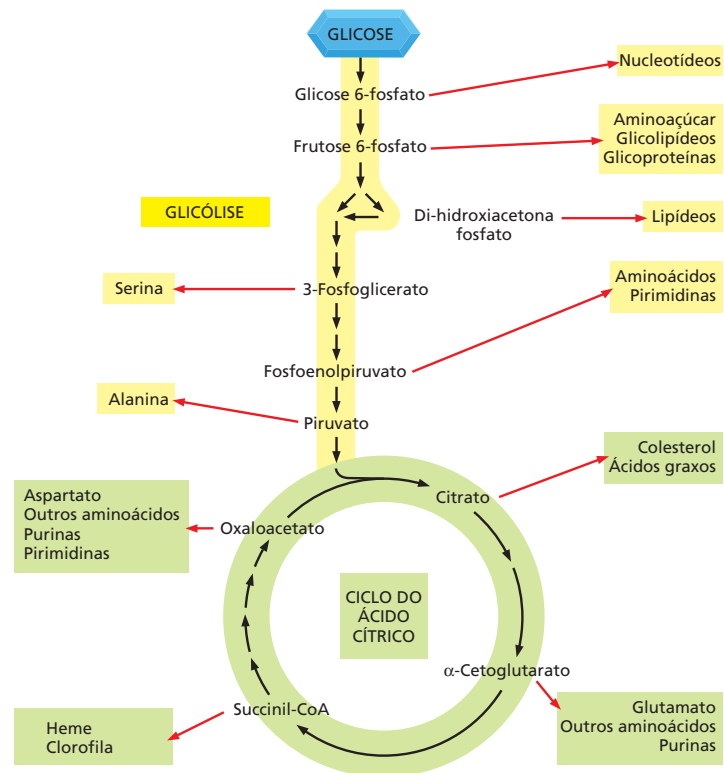



Figura 13-17 A glicólise e o ciclo do ácido cítrico produzem muitos dos precursores necessários para sintetizar muitas moléculas biológicas importantes. Os aminoácidos, os nucleotídeos, os lipídeos, os açúcares e as outras moléculas – representadas aqui como produtos –, por sua vez, servem de precursores para as muitas macromoléculas da célula. Cada *seta preta* neste diagrama indica uma reação catalisada por uma única enzima; as *setas vermelhas* geralmente representam vias com as diversas etapas necessárias para produzir os produtos indicados.

O transporte de elétrons impulsiona a síntese da maior parte do ATP na maioria das células

Retornaremos a última etapa da oxidação de uma molécula de alimento – o estágio no qual a maior porção de sua energia química é liberada. Nesse processo final, os carreadores de elétrons NADH e $FADH_2$ transferem os elétrons que ganharam ao oxidar outras moléculas para a **cadeia transportadora de elétrons**. Essa cadeia especializada de carreadores de elétrons está embebida na membrana mitocondrial interna nas células eucarióticas (na membrana plasmática de bactérias). Ao passar ao longo dessa série de moléculas aceptoras e doadoras de elétrons que formam a cadeia, esses caem sucessivamente a estados de energia mais baixos. A energia liberada nesse processo é utilizada para impulsionar íons H^+ (prótons) através da membrana, do compartimento interno da mitocôndria para o exterior. Isso gera um gradiente transmembrana de íons H^+ que serve como fonte de energia (como uma bateria) que pode ser explorada para conduzir uma variedade de reações que requerem energia (ver Capítulo 12). Na mitocôndria, a mais proeminente dessas reações é a fosforilação de ADP para gerar ATP.

No final da cadeia de transporte, os elétrons são adicionados a moléculas de O_2 que difundiram para dentro das mitocôndrias; as moléculas de O_2 reduzidas resultantes combinam simultaneamente com prótons (H^+) a partir da solução circundante para produzir água. Nesse momento, os elétrons alcançaram seu nível de energia mais baixo, e toda a energia disponível foi extraída das moléculas de alimento sendo oxidadas. A geração de ATP que requer oxigênio é chamada **fosforilação oxidativa** (Figura 13-18). A fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias das células eucarióticas e na membrana plasmática de bactérias aeróbias e é uma das mais extraordinárias realizações da evolução celular. Dessa forma, a fosforilação oxidativa será o principal tópico do Capítulo 14.

QUESTÃO 13-4

Observando a química detalhada no Painel 13-2 (p. 442-443), por que você acha que é útil ligar o grupo acetila primeiro a outro esqueleto de carbono, o oxaloacetato, antes de oxidar completamente os dois carbonos a CO_2?

Figura 13-18 **Nos estágios finais da oxidação de moléculas de alimento, NADH (e $FADH_2$, não mostrado) produzida pelo ciclo do ácido cítrico doa elétrons de alta energia que finalmente reduzem O_2 à água.** Uma grande porção da energia liberada durante uma série elaborada de transferências eletrônicas na membrana mitocondrial interna (ou na membrana plasmática de bactérias) é aproveitada para conduzir a síntese de ATP por meio do processo de fosforilação oxidativa.

No total, a oxidação completa de uma molécula de glicose a H_2O e CO_2 produz em torno de 30 moléculas de ATP. (Para uma explicação de onde exatamente essas moléculas de ATP procedem, ver Tabela 14-1, p. 465.) Em contrapartida, apenas duas moléculas de ATP são produzidas por molécula de glicose pela glicólise sozinha.

QUESTÃO 13-5

O que está errado com a seguinte afirmação (se há algo errado com ela): "O oxigênio consumido durante a oxidação de glicose em células animais é devolvido à atmosfera como parte do CO_2". Como você poderia justificar sua resposta experimentalmente?

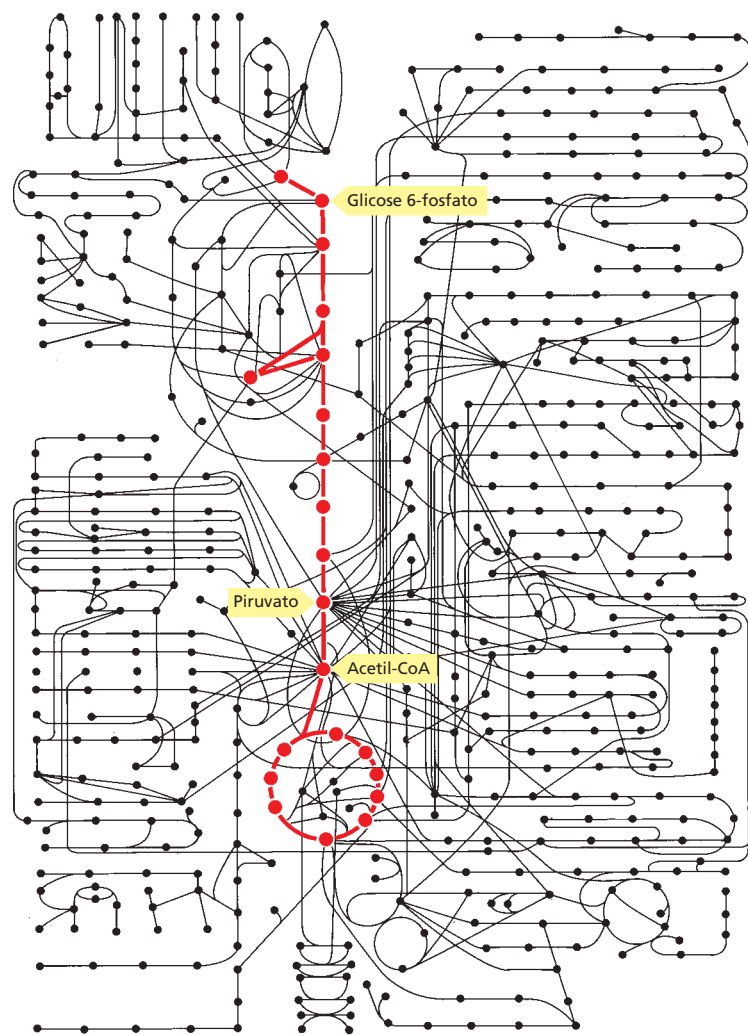
REGULAÇÃO DO METABOLISMO

A célula é uma máquina química complicada, e nossa discussão sobre o metabolismo – com enfoque na glicólise e no ciclo do ácido cítrico – trata apenas de uma pequena fração das várias reações enzimáticas que podem ocorrer em uma célula a qualquer momento (**Figura 13-19**). Para que todas essas vias trabalhem facilmente em conjunto, como é necessário para permitir que a célula sobreviva e responda a seu meio, a escolha de qual via cada metabólito seguirá deve ser cuidadosamente regulada a cada ponto de ramificação.

Muitos grupos de reações precisam ser cuidadosamente controlados. Por exemplo, para manter a ordem dentro de suas células, todos os organismos precisam restaurar constantemente seus reservatórios de ATP por meio da oxidação do açúcar ou das gorduras (ver Figura 13-10). Contudo, os animais têm apenas acesso periódico ao alimento, e as plantas precisam sobreviver durante a noite sem a luz do sol, quando são incapazes de produzir açúcar a partir da fotossíntese. Plantas e animais evoluíram alguns meios para passar por esse problema. Um deles é sintetizar reservas de alimento que podem ser consumidas mais adiante quando outras fontes de energia forem escassas. Dessa forma, uma célula deve controlar se metabólitos-chave serão direcionados para vias anabólicas ou catabólicas – em outras palavras, se eles serão encarregados na construção de outras moléculas ou queimados para prover energia imediata. Nesta seção, discutiremos como as células regulam as vias confusas interconectadas que formam a base do metabolismo.

As reações catabólicas e anabólicas são organizadas e reguladas

Todas essas reações mostradas na Figura 13-19 ocorrem em uma célula que tem menos de 0,1 mm de diâmetro, e cada etapa requer uma enzima diferente. Para complicar mais ainda, a mesma molécula frequentemente faz parte de muitas vias diferentes. O piruvato, por exemplo, é um substrato para meia dúzia ou mais de diferentes enzimas, e cada uma delas o modifica quimicamente de uma forma diferente. Como vimos, a piruvato-desidrogenase converte piruvato em

Figura 13-19 A glicólise e o ciclo do ácido cítrico se situam no centro do metabolismo. Em torno de 500 reações metabólicas de uma célula típica são demonstradas esquematicamente com as reações da glicólise e do ciclo do ácido cítrico em *vermelho.* As outras reações ou levam a essas duas vias centrais – entregando pequenas moléculas para serem oxidadas para energia – ou levam para fora e assim suprem compostos de carbono para a biossíntese. Os círculos representam moléculas nas várias vias metabólicas, e as linhas que as conectam representam as reações enzimáticas que convertem um metabólito em outro.

acetil-CoA, e a lactato-desidrogenase o converte em lactato; uma terceira enzima converte o piruvato em oxaloacetato, uma quarta, no aminoácido alanina, e assim por diante. Todas essas diferentes vias competem pela mesma molécula de piruvato, e competições semelhantes por milhares de outras pequenas moléculas acontecem ao mesmo tempo. Poderia pensar-se que o sistema como um todo é tão finamente balanceado que qualquer pequeno distúrbio, como uma mudança temporária na dieta, seria desastroso.

De fato, o balanço metabólico de uma célula é surpreendentemente estável. Sempre que o balanço é perturbado, a célula reage de forma a restaurar o estado inicial: as células podem adaptar-se e continuar a funcionar durante a inanição ou a doença. Essa elasticidade é possível em função de uma rede elaborada de *mecanismos de controle* que agem nas enzimas para regular e coordenar as taxas de muitas reações metabólicas na célula.

Como vimos no Capítulo 4, a atividade das enzimas pode ser controlada de várias formas diferentes. Muitas proteínas são ligadas e desligadas por modificações covalentes, como a adição ou a remoção de um grupo fosfato (ver Figura 4-38). Alternativamente, suas atividades podem ser controladas pela ligação de uma pequena molécula reguladora – muitas vezes um metabolito – a uma enzima alostérica (ver p. 151-152). Tal regulação pode ser positiva, aumentando a atividade da enzima, ou negativa, inibindo-a. Como veremos a seguir, ambos

QUESTÃO 13-6

Uma via de reações cíclicas requer que o material de partida seja regenerado e esteja disponível no final de cada ciclo. Se compostos do ciclo do ácido cítrico são desviados para servir de precursores utilizados em uma variedade de reações metabólicas, por que o ciclo do ácido cítrico não é rapidamente interrompido?

os tipos de regulação – positiva ou negativa – controlam a atividade de enzimas-chave envolvidas na glicólise.

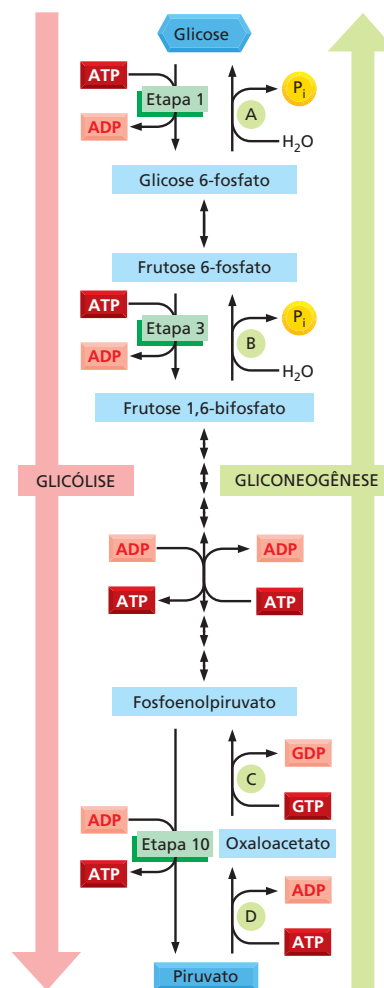
A regulação da retroalimentação permite que as células troquem de degradação de glicose para biossíntese de glicose

O corpo necessita de um suprimento constante de glicose para atingir suas necessidades metabólicas. Por exemplo, as células do cérebro dependem quase que completamente de glicose para a respiração. Durante períodos de jejum e durante o exercício físico pesado, a glicose na corrente sanguínea é utilizada com mais velocidade do que é sintetizada a partir do alimento. Uma maneira de repor a glicose do sangue é sintetizá-la a partir de pequenas moléculas orgânicas, que não são carboidrato, como lactato, piruvato ou aminoácidos em um processo denominado **gliconeogênese**. Um padrão confuso de regulação por retroalimentação permite que as células troquem de quebra da glicose pela glicólise para síntese de glicose pela gliconeogênese.

A maioria das reações envolvidas na quebra da glicose em piruvato é prontamente reversível. Entretanto, três das reações – etapas 1, 3 e 10 no Painel 13-1 – são irreversíveis. Na verdade, é a ampla mudança na energia livre negativa que ocorre nessas reações que normalmente direciona a quebra da glicose. Para que a via ocorra na direção oposta – para formar glicose a partir de piruvato –, essas três reações devem ser contornadas. Esse contorno é obtido pela substituição de um grupo de "reações de contorno" (*bypass reactions*) catalisadas por enzimas que requerem um depósito de energia química (reações A, B, C e D na Figura 13-20). Assim, as reações que sintetizam a molécula de glicose na gliconeogênese requerem a hidrólise de quatro moléculas de ATP e duas de GTP, comparada com a geração geral de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose consumida durante a glicólise.

Em humanos e outros mamíferos, a gliconeogênese ocorre principalmente nas células hepáticas, que podem manter a corrente sanguínea suprida de glicose pelo uso de várias moléculas diferentes como ponto de início. Um depósito comum é o lactato: essa molécula, produzida pelas células musculares sobrecarregadas, é captada pelo fígado, onde é convertida de volta em glicose para recarregar os músculos esgotados. O equilíbrio entre glicólise e gliconeogênese deve ser bastante regulado, de modo que a glicose seja quebrada rapidamente quando as reservas de energia baixarem, mas seja sintetizada e exportada para outros tecidos quando a célula hepática tiver reservas de energia suficientes na forma de piruvato, citrato ou ATP. Se fosse permitido que tanto as reações para frente como para trás na Figura 13-20 fossem ocorrer sem restrição, as reações ocorreriam em ambas as direções em ciclos fúteis que consumiriam grandes quantidades de energia e gerariam calor sem propósito.

Um dos pontos de controle chave na quebra da glicose está na etapa 3 da glicólise, a produção de frutose 1,6 -bifosfato pela enzima *fosfofrutocinase*. Essa é uma das reações que deve ser contornada na gliconeogênese (ver etapa 3 na Figura 13-20 ou no Painel 13-1, p. 430). A fosfofrutocinase é ativada alostericamente por AMP, ADP ou fosfato inorgânico – os subprodutos da hidrólise de ATP; ela é inibida alostericamente por ATP, citrato e combustíveis alternativos para respiração, como ácidos graxos, que podem ser liberados da gordura ar-

Figura 13-20 A gliconeogênese "reverte", de forma efetiva, as reações que ocorrem durante a glicólise. Um grupo de quatro reações de contorno (marcadas de A a D) é necessário para dar a volta pelas etapas 1, 3 e 10 na glicólise, que são essencialmente irreversíveis. Como pode ser visto, as reações sintéticas realizadas na gliconeogênese requerem um depósito de energia, e a glicólise como um todo é um grupo de reações energeticamente favorável. Para acompanhar a energia produzida ou consumida nesses processos, relembre que durante a glicólise, a frutose 1,6-bifosfato é clivada para formar dois açúcares de 3 carbonos (não mostrados). Assim, todas as reações que seguem, sendo parte da glicólise ou da gliconeogênese, envolvem dois açúcares – e o dobro do número de carreadores de energia – para cada molécula de glicose que é consumida ou produzida.

mazenada quando a glicose não estiver disponível. Assim, quando as reservas de energia estiverem baixas e os produtos da hidrólise de ATP acumularem, a fosfofrutocinase é ativada e a glicólise inicia. Por outro lado, quando o ATP ou fontes de combustível – representadas por citrato ou ácidos graxos – forem abundantes, a fosfofrutocinase é desativada, favorecendo a gliconeogênese e, por último, o armazenamento de moléculas de alimento. Para adicionar mais um nível de controle, a enzima que catalisa a reação reversa (frutose 1,6 -bifosfato; ver reação de retorno B na Figura 13-20) é regulada pelas mesmas moléculas – mas na direção oposta. Dessa forma, a enzima é ativada quando a fosfofrutocinase é desativada. Tal mecanismo regulador coordenado permite à célula responder rapidamente às alterações das condições ambientais e ajustar seu metabolismo de acordo.

As células armazenam moléculas de alimento em reservatórios especiais para se preparar para períodos de necessidade

Como vimos, a gliconeogênese é um processo caro que requer quantidades substanciais de energia a partir da hidrólise de ATP e GTP. Portanto, não pode ocorrer indefinidamente. Para compensar os longos períodos de ausência de alimento, os animais estocam reservas de alimento dentro de suas células. A glicose é estocada como subunidades de um grande polissacarídeo ramificado, **glicogênio**, o qual está presente como pequenos grânulos no citoplasma de muitas células, principalmente fígado e músculos (**Figura 13-21**; ver também Painel 2-3, p. 68-69). A síntese e a degradação do glicogênio ocorrem por vias metabólicas bastante separadas, que podem ser reguladas rápida e coordenadamente de acordo com a necessidade. Quando mais ATP é necessária do que o que pode ser gerado a partir das moléculas de alimento vindas da corrente sanguínea, as células quebram glicogênio em uma reação que produz *glicose 1-fosfato*, que é então convertida em glicose 6-fosfato que entra na via glicolítica.

As vias de síntese e degradação do glicogênio são coordenadas por enzimas em cada via que são reguladas alostericamente pela glicose 6-fosfato, mas em direções opostas: a *glicogênio-sintase* na via de síntese é ativada por glicose 6-fosfato, e a *glicogênio-fosforilase* que catalisa a quebra do glicogênio é inibida tanto pela glicose 6-fosfato como pelo ATP. Essa regulação ajuda a prevenir a quebra do glicogênio quando ATP está abundante e favorece a sua síntese quan-

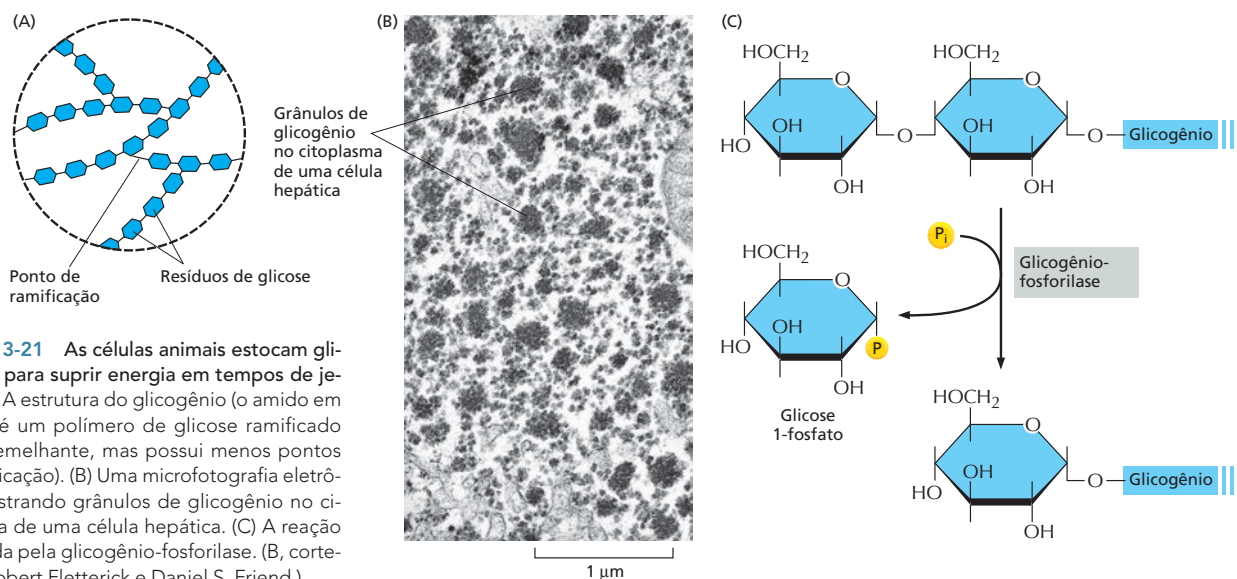



Figura 13-21 **As células animais estocam glicogênio para suprir energia em tempos de jejum.** (A) A estrutura do glicogênio (o amido em plantas é um polímero de glicose ramificado muito semelhante, mas possui menos pontos de ramificação). (B) Uma microfotografia eletrônica mostrando grânulos de glicogênio no citoplasma de uma célula hepática. (C) A reação catalisada pela glicogênio-fosforilase. (B, cortesia de Robert Fletterick e Daniel S. Friend.)

do a concentração de glicose 6-fosfato está alta. O equilíbrio entre a síntese e a quebra de glicogênio também é regulado por vias de sinalização intracelular que são controladas pelos hormônios insulina, adrenalina e glucagon (ver Tabela 16-1, p. 535 e Figura 16-23, p. 550).

Quantitativamente, a **gordura** é uma forma de armazenagem muito mais importante do que o glicogênio, em parte porque a oxidação de um grama de gordura libera cerca de duas vezes mais energia do que a oxidação de um grama de glicogênio. Além disso, o glicogênio se associa a um grande volume de água, produzindo uma diferença de seis vezes na massa efetiva de glicogênio necessária para estocar a mesma quantidade de energia que a gordura. Um humano adulto médio armazena glicogênio suficiente para apenas cerca de um dia de atividades normais, mas gordura suficiente para durar aproximadamente um mês. Se nosso reservatório principal de combustível tivesse de ser carregado na forma de glicogênio, em vez de gordura, o peso corporal precisaria ser aumentado em uma média de 30 quilos.

A maioria de nossa gordura é estocada como gotículas de triacilgliceróis insolúveis em água, em células adiposas especializadas (**Figura 13-22**; ver Painel 2-4, p. 70-71). Em resposta a sinais hormonais, os ácidos graxos podem ser liberados desses depósitos para a corrente sanguínea para a utilização por outras células conforme necessário. A necessidade surge após um período sem comer; até mesmo um jejum normal durante a noite resulta na mobilização da gordura. Pela manhã, a maioria da acetil-CoA que entra no ciclo do ácido cítrico deriva de ácidos graxos, e não da glicose. Após uma refeição, entretanto, a maioria da acetil-CoA que entra no ciclo do ácido cítrico se origina da glicose derivada do alimento, e qualquer excesso de glicose é utilizado para reabastecer estoques de glicogênio esgotados ou para sintetizar gorduras. (Embora as células animais prontamente possam converter açúcares em gorduras, elas não podem converter ácidos graxos em açúcares.)

Figura 13-22 As gorduras são armazenadas na forma de gotículas de gordura nas células animais. Gotículas de gordura (coradas de *vermelho*) começando a se acumular em células adiposas em desenvolvimento. (Cortesia de Peter Tontonoz e Ronald M. Evans.)

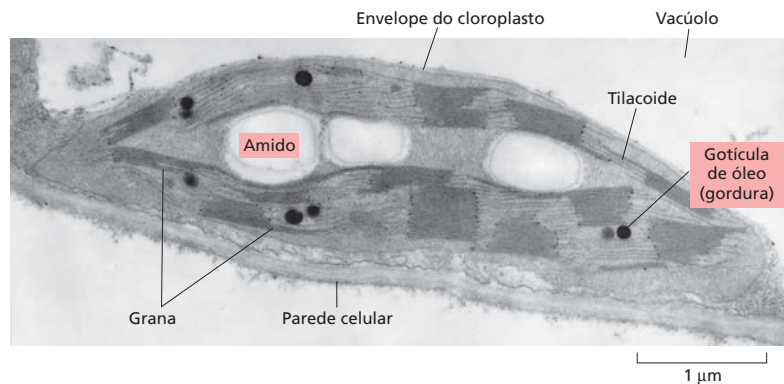
As reservas de alimento tanto em animais como em plantas formam uma parte vital da dieta humana. As plantas convertem uma parte dos açúcares que produzem pela fotossíntese durante o dia em gorduras e **amido**, um polímero ramificado de glicose análogo ao glicogênio dos animais. As gorduras das plantas são triacilgliceróis, assim como as gorduras nos animais, e diferem apenas nos tipos predominantes de ácidos graxos.

Os embriões no interior das sementes das plantas devem viver das fontes de energia estocadas por um período prolongado, até que germinem para produzir folhas que possam aproveitar a energia da luz solar. O embrião utiliza essas reservas como fonte de energia e de pequenas moléculas para construir suas paredes celulares e sintetizar muitas outras moléculas biológicas à medida que se desenvolvem. Por essa razão, as sementes das plantas com frequência contêm quantidades especialmente grandes de gorduras e de amido – o que as tornam uma fonte principal de alimento para os animais, incluindo os humanos (**Figura 13-23**). As sementes em germinação convertem a gordura e o amido estocados em glicose conforme a necessidade.

QUESTÃO 13-7

Após contemplar as estruturas de açúcares e de ácidos graxos (discutidos no Capítulo 2), explique por que a oxidação de um açúcar rende apenas metade da energia que a oxidação de um peso seco equivalente de um ácido graxo.

Figura 13-23 Algumas sementes de plantas servem como alimentos importantes para os humanos. O milho, as nozes e as ervilhas contêm estoques ricos em amido e gordura que suprem o embrião jovem da planta na semente com energia e precursores para a biossíntese. (Cortesia de John Innes Foundation.)

Figura 13-24 As células vegetais estocam tanto amido quanto gordura em seus cloroplastos. Uma fina secção de um único cloroplasto de uma célula vegetal mostrando os grânulos de amido e as gotículas lipídicas que se acumularam como resultado da biossíntese que ocorre aí. (Cortesia de K. Plaskitt.)

Nas plantas, as gorduras e o amido são estocados no cloroplasto – uma organela especializada que realiza a fotossíntese nas células vegetais (Figura 13-24). Lá servem de reservatórios de alimento que podem ser mobilizados para produzir ATP durante os períodos de escuridão.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- A glicose e outras moléculas de alimento são quebradas por oxidação gradual e controlada para prover energia química útil na forma dos carreadores ativados ATP e NADH.
- Os açúcares derivados do alimento são quebrados por conjuntos distintos de reações: a glicólise (a qual ocorre no citosol), o ciclo do ácido cítrico (na matriz mitocondrial) e a fosforilação oxidativa (na membrana mitocondrial interna).
- As reações da glicólise degradam o açúcar de seis carbonos, a glicose, a duas moléculas de açúcar de três carbonos, o piruvato, produzindo uma quantidade relativamente pequena de ATP e NADH.
- Na presença de oxigênio, o piruvato é convertido em acetil-CoA mais CO_2. O ciclo do ácido cítrico então converte o grupo acetila da acetil-CoA em CO_2 e H_2O. Uma grande quantidade da energia liberada nessas reações de oxidação é estocada na forma de elétrons de alta energia nos carreadores ativados NADH e $FADH_2$. Nas células eucarióticas, todas essas reações ocorrem nas mitocôndrias.
- A outra principal fonte de energia nos alimentos é a gordura. Os ácidos graxos produzidos a partir da digestão das gorduras são importados para dentro das mitocôndrias e convertidos a moléculas de acetil-CoA. Essas moléculas de acetil-CoA são então ainda mais oxidadas pelo ciclo do ácido cítrico, produzindo NADH e $FADH_2$, da mesma forma que a acetil-CoA derivada do piruvato.
- A NADH e a $FADH_2$ passam seus elétrons de alta energia a uma cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial interna, onde uma série de transferência de elétrons é utilizada para conduzir a formação de ATP. A maioria da energia capturada durante a quebra de moléculas de alimento é colhida durante esse processo de fosforilação oxidativa (descrito em detalhe no Capítulo 14).
- O alimento que ingerimos não é apenas uma fonte de energia metabólica, mas também fonte de material bruto para biossíntese. Vários intermediários da glicólise e do ciclo do ácido cítrico são pontos iniciais para vias que levam à síntese de proteína, ácidos nucleicos e várias outras moléculas especializadas da célula.

- **As milhares de diferentes reações executadas simultaneamente por uma célula são extremamente coordenadas, permitindo que a célula se adapte e continue a funcionar sob uma ampla variedade de condições externas.**
- **Durante os períodos de escassez de alimento, a regulação das atividades de algumas enzimas-chave permite à célula trocar de quebra de glicose para biossíntese de glicose (gliconeogênese).**
- **As células estocam as moléculas de alimento em reservatórios especiais. As subunidades de glicose são estocadas na forma de glicogênio nos animais e de amido nas plantas; tanto os animais quanto as plantas estocam ácidos graxos na forma de gorduras. As reservas de alimento armazenadas pelas plantas são as fontes principais de alimento para os animais, incluindo humanos.**

TERMOS-CHAVE

acetil-CoA
ADP, ATP
catabolismo
ciclo do ácido cítrico
cadeia transportadora de elétrons
FAD, $FADH_2$
gordura
fermentação
GDP, GTP
glicose
glicogênio
gliconeogênese
glicólise
NAD^+, NADH
fosforilação oxidativa
piruvato
amido

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 13-8

A oxidação de moléculas de açúcar pela célula ocorre de acordo com a reação geral $C_6H_{12}O_6$ (glicose) + 6 O_2 → 6 CO_2 + 6 H_2O + energia. Quais das afirmações seguintes são corretas? Explique suas respostas.

A. Toda energia é produzida na forma de calor.
B. Nada da energia é produzida na forma de calor.
C. A energia é produzida por um processo que envolve a oxidação de átomos de carbono.
D. A reação supre a célula com a água necessária.
E. Nas células, as reações ocorrem em mais de uma etapa.
F. Muitas etapas na oxidação de moléculas de açúcar envolvem reações com o gás oxigênio.
G. Alguns organismos executam a reação inversa.
H. Algumas células que crescem na ausência de O_2 produzem CO_2.

QUESTÃO 13-9

Um instrumento extraordinariamente sensível (ainda por ser inventado) mostra que um dos átomos de carbono do último suspiro de Charles Darwin está presente na sua corrente sanguínea, onde faz parte de uma molécula de hemoglobina. Sugira como esse átomo de carbono viajou de Darwin até você e liste algumas das moléculas das quais ele possa ter feito parte no caminho.

QUESTÃO 13-10

As células de levedura podem crescer tanto em presença de O_2 (aerobiamente) quanto na sua ausência (anaerobiamente). Em qual das duas condições você espera que as células cresçam melhor? Explique sua resposta.

QUESTÃO 13-11

Durante o movimento, as células musculares requerem grandes quantidades de ATP para abastecer seu aparelho contrátil. Essas células contêm altos níveis de creatina fosfato (indicado na Figura 13-7). Por que esse é um composto útil para estocar energia? Justifique sua resposta com a informação exposta na Figura 13-7.

QUESTÃO 13-12

Vias idênticas que compõem a complicada sequência de reações da glicólise, representada no Painel 13-1 (p. 430-431), são encontradas na maioria das células vivas, das bactérias aos humanos. É possível prever, entretanto, inúmeros mecanismos alternativos de reações químicas que permitiriam a oxidação das moléculas de açúcar e que poderiam, em princípio, ter evoluído para tomar o lugar da glicólise. Discuta esse fato no contexto da evolução.

QUESTÃO 13-13

Suponha que uma célula animal é um cubo que tem o comprimento lateral de 10 μm. A célula contém 10^9 moléculas de ATP, as quais ela esgota a cada minuto. A ATP é regenerada pela oxidação de moléculas de glicose. Após quanto tempo a célula terá

gasto uma quantidade de gás oxigênio que seja igual ao seu próprio volume? (Lembre que um mol contém 6×10^{23} moléculas. Um mol de um gás tem um volume de 22,4 litros.)

QUESTÃO 13-14

Sob as condições existentes na célula, as energias livres das primeiras poucas reações da glicólise (no Painel 13-1, p. 430- 431) são:

etapa 1 ΔG = – 8,0 kcal/mol (–33,4 kJ/mol)

etapa 2 ΔG = – 0,6 kcal/mol (–2,5 kJ/mol)

etapa 3 ΔG = – 5,3 kcal/mol (–22,2 kJ/mol)

etapa 4 ΔG = – 0,3 kcal/mol (–1,3 kJ/mol)

Essas reações são favoráveis energeticamente? Usando esses valores, desenhe em escala um diagrama de energia (A) para a reação como um todo e (B) para a via composta das quatro reações individuais.

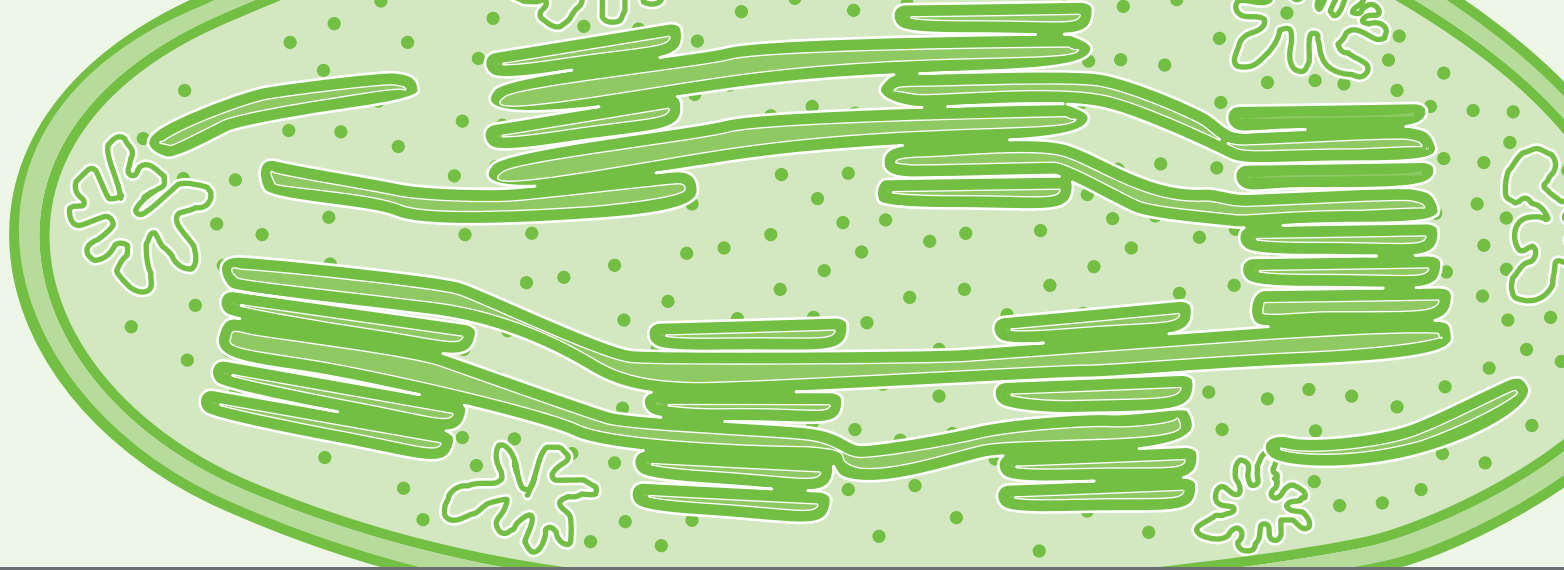
QUESTÃO 13-15

A química da maioria das reações metabólicas foi decifrada pela síntese de metabólitos contendo átomos que são isótopos diferentes dos que ocorrem naturalmente. Os produtos das reações que se iniciam com metabólitos isotopicamente marcados podem ser analisados para determinar com precisão que átomos nos produtos são derivados de que átomos no material de partida. Os métodos de detecção exploram, por exemplo, o fato de que diferentes isótopos possuem diferentes massas que podem ser distinguidas utilizando técnicas da biofísica, como espectrometria de massa. Além disso, alguns isótopos são radioativos e podem, portanto, ser prontamente reconhecidos com contadores eletrônicos ou filmes fotográficos expostos à radiação.

A. Suponha que o piruvato contendo ^{14}C radioativo no grupo carboxila seja adicionado a um extrato celular capaz de exercer a fosforilação oxidativa. Qual composto produzido conterá a grande maioria do ^{14}C adicionado?

B. Suponha que o oxaloacetato contendo ^{14}C radioativo em seu grupo cetona (dirija-se ao Painel 13-2, p. 442-443) seja adicionado ao extrato. Onde estaria o átomo de ^{14}C após precisamente uma volta do ciclo?

QUESTÃO 13-16

Nas células que podem crescer tanto aeróbia quanto anaerobiamente, a fermentação é inibida na presença de O_2. Sugira uma razão para essa observação.

CAPÍTULO 14

A Geração de Energia em Mitocôndrias e Cloroplastos

A necessidade fundamental de gerar energia eficientemente determinou uma influência profunda na história da vida sobre a Terra. Muito da estrutura, da função e da evolução das células e dos organismos pode ser relacionado às suas necessidades por energia. As células mais primitivas devem ter produzido ATP pela degradação de moléculas orgânicas remanescentes de processos geoquímicos anteriores, utilizando alguma forma de fermentação. As reações de fermentação ocorrem no citosol das células atuais. Como discutido no Capítulo 13, essas reações utilizam a energia derivada da oxidação parcial de moléculas nutrientes ricas em energia para formar ATP – a moeda corrente de energia química das células.

Entretanto, nos primeiros tempos da história da vida, surgiu um método muito mais eficiente de geração de energia e síntese de ATP. Esse processo se baseia no transporte de elétrons através de membranas. Bilhões de anos mais tarde, tal processo é tão fundamental para a existência de vida na Terra que devotamos este capítulo inteiro a ele. Como veremos, esse mecanismo com base em membranas é utilizado pelas células para adquirir energia a partir de uma variedade de fontes: por exemplo, ele é central na conversão da energia luminosa em energia química na fotossíntese e para a respiração aeróbia, que nos permite utilizar oxigênio para produzir grandes quantidades de ATP a partir de moléculas nutrientes. O mecanismo que iremos descrever surgiu primeiramente em Bacteria há mais de 3 bilhões de anos. Os descendentes dessas células pioneiras preencheram cada canto e cada fissura das terras e dos oceanos com uma absurda variedade de formas vivas, e elas sobrevivem dentro de células eucarióticas na forma de cloroplastos e mitocôndrias.

De onde viemos e como se definiram as nossas relações com as outras formas de vida são questões que fascinaram os seres humanos desde o início dos tempos. A história que se pode contar hoje, definida por uma longa cadeia de investigações científicas, é uma das mais dramáticas e excitantes jamais con-

tadas, e ainda não a terminamos. A cada ano, novas descobertas em biologia celular nos permitem adicionar mais detalhes por meio de trabalhos moleculares investigativos de poder impressionantemente maior.

Absolutamente central para a progressão da vida foi a provisão de uma abundante fonte de energia para as células. Neste capítulo, será discutido o mecanismo notável que tornou tudo isso possível.

As células obtêm a maior parte da sua energia a partir de um mecanismo com base em membranas

A principal moeda corrente de energia química nas células é o ATP (ver Figura 3-32). Em células eucarióticas, pequenas quantidades de ATP são geradas durante a glicólise no citosol (como discutido no Capítulo 13). O mecanismo pelo qual grande parte de ATP é produzida na mitocôndria difere da maneira pela qual ela é gerada na glicólise, envolvendo uma membrana: a fosforilação oxidativa depende do transporte de elétrons no interior da membrana mitocondrial e do transporte de íons através dela. O mesmo tipo de processo gerador de ATP ocorre na membrana plasmática das bactérias. O mecanismo para produzir ATP com base na membrana surgiu muito cedo na história da vida e teve um sucesso tão grande que suas características essenciais têm sido mantidas ao longo da jornada evolutiva desde os procariotos até as células modernas. Nas bactérias fotossintéticas, nas plantas e nas algas, um processo com base na membrana produz ATP durante a fotossíntese.

O processo consiste em dois estágios interligados, ambos conduzidos por complexos proteicos embebidos em uma membrana.

Estágio 1. Elétrons derivados da oxidação de moléculas nutrientes (discutido no Capítulo 13) ou de outras fontes (discutidas mais adiante) são transferidos ao longo de uma série de carreadores de elétrons – chamados de **cadeia transportadora de elétrons** – embebidos na membrana. As transferências de elétrons liberam energia, que é utilizada para bombear prótons (H^+), derivados da água que está onipresente nas células, através da membrana e, portanto, gerando um gradiente eletroquímico de prótons (**Figura 14-1A**). Um gradiente de íons através de uma membrana é uma forma de estocar energia que pode ser aproveitada para produzir um trabalho útil quando os íons são permitidos a fluir de volta, novamente através da membrana, a favor do seu gradiente eletroquímico (como discutido no Capítulo 12).

Estágio 2. Os H^+ fluem de volta, a favor do gradiente eletroquímico, através de um complexo proteico chamado de *ATP-sintase,* o qual catalisa

Figura 14-1 As células desenvolveram sistemas para capturar a energia necessária para a vida. (A) Os requerimentos essenciais para a quimiosmose são uma membrana, na qual está embebida uma bomba proteica e uma ATP-sintase, e fontes de elétrons de alta energia (e^-) e de prótons (H^+). A bomba aproveita a energia da transferência de elétrons (detalhes não apresentados aqui) para bombear prótons derivados da água, criando um gradiente de prótons através da membrana. Os elétrons de alta energia podem ser fornecidos por moléculas orgânicas ou inorgânicas, ou podem ser produzidos pela ação da luz em moléculas especiais, como a clorofila. (B) O gradiente produzido em (A) serve como um suprimento versátil de energia. Esse gradiente promove uma variedade de reações que requerem energia nas mitocôndrias, nos cloroplastos e nas bactérias – incluindo a síntese de ATP pela ATP-sintase. A *seta vermelha* indica a direção do movimento de prótons em cada estágio.

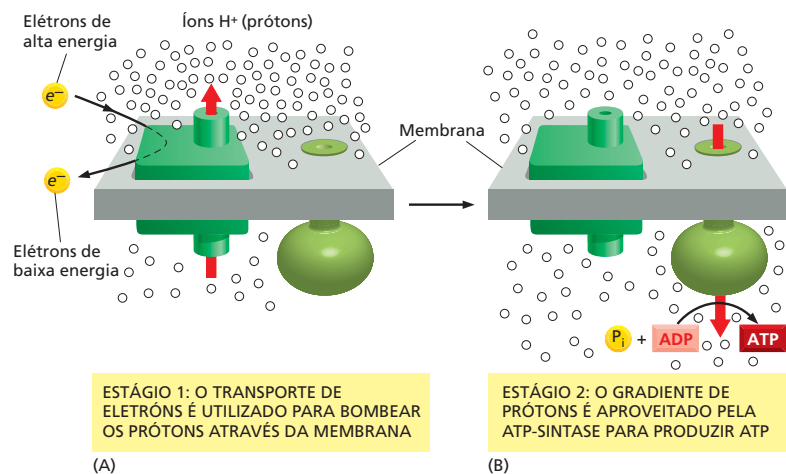
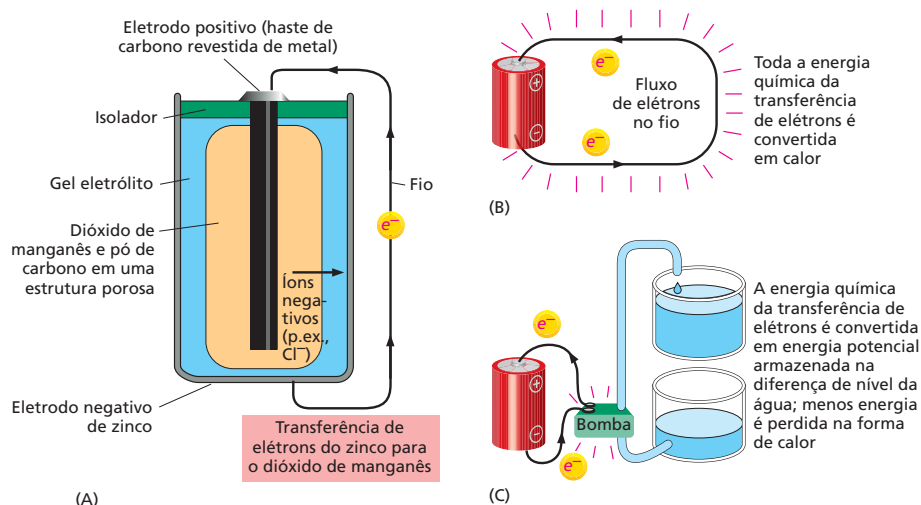



Figura 14-2 **Baterias são capazes de produzir energia por meio de reações químicas com base na transferência de elétrons.** (A) Quando uma bateria comum de uma lanterna é conectada em um circuito, elétrons fluem do recipiente de metal, o qual é feito de zinco (Zn), para átomos de manganês, no dióxido de manganês (MnO_2). O Zn^{2+} e o óxido de manganês (MnO) são formados como produtos. (O carbono da bateria serve simplesmente como condutor de elétrons.) (B) Se os terminais da bateria forem conectados diretamente um ao outro, a energia liberada pela transferência dos elétrons é totalmente convertida em calor. (C) Se a bateria for conectada a uma bomba, grande parte da energia liberada pela transferência dos elétrons pode ser aproveitada para realizar trabalho (nesse caso, uma bomba de água). As células, de forma semelhante, podem aproveitar a energia de transferência dos elétrons para um mecanismo de bombeamento, como ilustrado na Figura 14-1.

a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (P_i). Essa enzima onipresente funciona como uma turbina, fazendo com que o gradiente de prótons propulsione a produção de ATP (Figura 14-1B).

A união do transporte de elétrons, do bombeamento de prótons e da síntese de ATP foi denominada *hipótese quimiosmótica* quando foi proposta pela primeira vez na década de 1960, em virtude da associação entre as reações formadoras de ligações químicas que sintetizam ATP (“quimi”) e o processo de transporte através da membrana (“osmótico”, do grego *osmos,* “empurrar”). Hoje é conhecida como **acoplamento quimiosmótico**. Os mecanismos quimiosmóticos permitem que as células aproveitem a energia da transferência de elétrons da mesma forma que a energia armazenada em uma bateria pode ser aproveitada para realizar um trabalho útil (**Figura 14-2**).

O acoplamento quimiosmótico evoluiu primeiro nas bactérias. As células eucarióticas aeróbias parecem ter adotado o mecanismo quimiosmótico bacteriano de forma intacta, primeiro pelo engolfamento de bactérias aeróbias para formar as mitocôndrias e, de alguma forma mais tarde – nas linhagens que levaram às algas e às plantas –, pelo engolfamento de cianobactérias para formar os cloroplastos, como descrito no Capítulo 1 (ver Figuras 1-19 e 1-21).

Neste capítulo, deveremos considerar a geração de energia tanto em mitocôndrias quanto cloroplastos, enfatizando os princípios comuns pelos quais gradientes de prótons são criados e utilizados nessas organelas e nas membranas plasmáticas das bactérias. Iniciaremos pela descrição da estrutura e da função das mitocôndrias, observando em detalhes os eventos que ocorrem na membrana mitocondrial para criar o gradiente de prótons e gerar ATP. Consideraremos, a seguir, a fotossíntese nos cloroplastos das células vegetais. Finalmente, serão traçadas as vias evolutivas que deram origem a esses mecanismos de geração de energia. Pelo exame dos estilos de vida de uma variedade de organismos unicelulares – incluindo aqueles que se assemelham aos nossos ancestrais primitivos –, é possível começar a ver o papel que o acoplamento quimiosmótico tem exercido na origem de eucariotos complexos e no desenvolvimento de toda a vida na Terra.

QUESTÃO 14-1

O dinitrofenol (DNP) é uma pequena molécula que torna as membranas permeáveis a prótons. Na década de 1940, pequenas quantidades desse composto altamente tóxico foram administradas a pacientes para induzir a perda de peso. O DNP foi efetivo na promoção da perda de peso, especialmente das reservas lipídicas. Você poderia explicar como ele pode causar tal perda? Como reação colateral indesejada, entretanto, os pacientes tiveram elevação da temperatura e suavam profusamente durante o tratamento. Forneça uma explicação para esses sintomas.

AS MITOCÔNDRIAS E A FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

As **mitocôndrias** estão presentes em quase todas as células eucarióticas – em plantas, animais e na maioria dos microrganismos eucarióticos –, e é nessas organelas que a maior parte do ATP celular é produzido. Sem elas, os eucariotos atuais seriam dependentes do processo relativamente ineficiente de glicólise para a produção de todo o seu ATP, e parece improvável que organismos multicelulares complexos poderiam ter surgido dessa maneira. Quando a glicose é convertida em piruvato na glicólise, somente duas moléculas de ATP são produzidas por molécula de glicose (menos de 10% da energia livre total potencialmente disponível). Em comparação, nas mitocôndrias, o metabolismo dos açúcares é completado, e a energia liberada é aproveitada tão eficientemente que cerca de 30 moléculas de ATP são produzidas para cada molécula de glicose oxidada.

Defeitos no funcionamento mitocondrial podem repercutir gravemente em um organismo. Considere, por exemplo, um distúrbio genético chamado de *epilepsia mioclônica com fibras vermelhas rotas* (*MERRF*). Essa doença, causada por uma mutação em um dos genes mitocondriais codificadores de RNA transportador (tRNA), é caracterizada por uma diminuição na síntese de proteínas mitocondriais necessárias para o transporte de elétrons e para a produção de ATP. Como resultado, pacientes com esse distúrbio experimentam, tipicamente, fraqueza muscular ou problemas cardíacos (dos efeitos no músculo cardíaco) e epilepsia ou demência (dos efeitos nas células nervosas). Tecidos musculares e nervosos sofrem mais quando as mitocôndrias são defeituosas, porque eles, em especial, precisam de grandes quantidades de ATP para seu funcionamento ótimo.

As mesmas reações metabólicas que ocorrem nas mitocôndrias também ocorrem em bactérias aeróbias, as quais não possuem essas organelas; nesses organismos, a membrana plasmática conduz o processo de acoplamento quimiosmótico. Contudo, diferentemente da célula de bactéria, a qual também deve cumprir muitas outras funções, a mitocôndria se tornou altamente especializada para geração de energia.

Uma mitocôndria possui uma membrana externa, uma membrana interna e dois compartimentos internos

As mitocôndrias são em geral semelhantes em tamanho e forma às bactérias, embora esses atributos possam variar dependendo do tipo celular. Elas contêm seu próprio DNA e RNA, bem como um sistema completo de transcrição e tradução, incluindo ribossomos, o que as permite sintetizar algumas de suas próprias proteínas. Filmagens de células vivas realizadas em intervalos de tempo revelam que as mitocôndrias são organelas notavelmente móveis, que mudam de formato e posição de forma constante. Presentes em grande número – 1.000 a 2.000 em uma célula hepática, por exemplo –, essas organelas podem formar longas cadeias móveis em associação com microtúbulos do citoesqueleto (discutido no Capítulo 17). Em outras células, elas permanecem fixas em um local da célula para direcionar ATP de modo direto a um sítio de consumo atipicamente alto de ATP. Em uma célula muscular cardíaca, por exemplo, as mitocôndrias estão localizadas próximas aos aparelhos contráteis, ao passo que, no espermatozoide, elas estão firmemente presas ao redor do flagelo motor (**Figura 14-3**). O número de mitocôndrias presentes em diferentes tipos celulares varia muito e pode mudar com a necessidade de energia da célula. Em uma célula muscular esquelética, por exemplo, o número de mitocôndrias pode aumentar de cinco a dez vezes em virtude do crescimento e da divisão mitocondrial que ocorre se o músculo é repetidamente estimulado a contrair-se.

Cada mitocôndria é envolta por duas membranas altamente especializadas – uma cobrindo a outra – que executam uma parte crucial das suas atividades. As membranas mitocondriais externa e interna criam dois compartimentos mi-

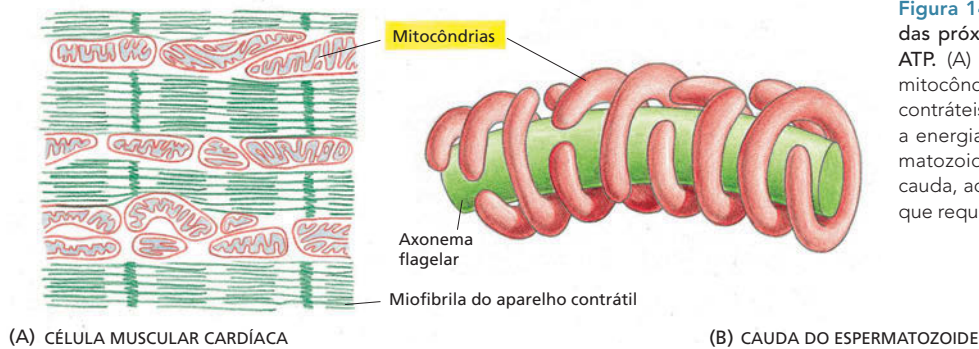



Figura 14-3 As mitocôndrias estão localizadas próximas aos sítios de alta utilização de ATP. (A) Em uma célula muscular cardíaca, as mitocôndrias se situam próximas aos aparelhos contráteis, nos quais a hidrólise de ATP fornece a energia para a contração. (B) Em um espermatozoide, as mitocôndrias se encontram na cauda, ao redor do axonema do flagelo motor que requer ATP para o seu movimento.

tocondriais: um grande espaço interno chamado de **matriz** e um *espaço intermembranas* muito mais estreito (**Figura 14-4**). Se mitocôndrias purificadas são suavemente processadas e fracionadas nos seus diferentes componentes por centrifugação diferencial (ver Painel 4-4, p. 164-165), a composição bioquímica de cada uma das duas membranas e do espaço entre elas pode ser determinada. Cada um contém uma coleção única de proteínas.

A *membrana externa* contém muitas moléculas de uma proteína de transporte denominada porina, a qual, como descrita no Capítulo 11, forma largos canais aquosos através da bicamada lipídica. Como resultado, a membrana externa é como uma peneira, permeável a todas as moléculas de 5.000 dáltons ou menos, incluindo pequenas proteínas. Isso torna o espaço intermembranas quimicamente equivalente ao citosol em relação às pequenas moléculas que contêm. Em contrapartida, a *membrana interna,* como outras membranas da célula, é impermeável à passagem de íons e à maioria das pequenas moléculas, exceto onde uma rota é fornecida por proteínas de transporte de membrana. A matriz mitocondrial, portanto, contém apenas moléculas que podem ser seletivamente transportadas à matriz através da membrana interna, e o seu conteúdo é altamente especializado.

A membrana mitocondrial interna é o sítio de transporte de elétrons e bombeamento de prótons e contém a ATP-sintase. A maioria das proteínas embebidas na membrana mitocondrial interna são componentes da cadeia transportadora de elétrons, necessários para a fosforilação oxidativa. Essa membrana tem uma composição lipídica distinta e uma variedade de proteínas de transporte que per-

Figura 14-4 Uma mitocôndria é organizada em quatro compartimentos separados. Cada compartimento possui um conjunto único de proteínas que permite a realização de suas funções distintas. Em mitocôndrias do fígado, cerca de 67% das proteínas mitocondriais totais estão localizadas na matriz, 21% estão localizadas na membrana interna, 6%, na membrana externa, e 6%, no espaço intermembranas. (Cortesia de Daniel S. Friend.)

mitem a entrada de moléculas pequenas selecionadas, como piruvato e ácidos graxos, na matriz.

A membrana interna é normalmente rica em convoluções, formando uma série de invaginações, conhecidas por *cristas,* que se projetam para o espaço da matriz para aumentar enormemente a área de superfície da membrana interna (ver Figura 14-4). Esses dobramentos fornecem uma ampla superfície onde pode ocorrer a síntese de ATP; em uma célula hepática, por exemplo, as membranas mitocondriais internas de todas as mitocôndrias constituem cerca de um terço do total de membranas da célula. O número de cristas é três vezes maior em uma mitocôndria de célula muscular cardíaca do que em uma mitocôndria de uma célula hepática.

QUESTÃO 14-2

Fotomicrografias eletrônicas mostram que as mitocôndrias do músculo cardíaco possuem uma densidade muito maior de cristas do que as mitocôndrias das células da pele. Sugira uma explicação para essa observação

Elétrons de alta energia são gerados pelo ciclo do ácido cítrico

As mitocôndrias utilizam tanto o piruvato quanto os ácidos graxos como combustíveis. O piruvato provém principalmente da glicose e de outros açúcares, e os ácidos graxos são provenientes das gorduras. Essas moléculas combustíveis são transportadas pela membrana mitocondrial interna e então convertidas no crucial metabólito intermediário acetil-CoA por enzimas localizadas na matriz mitocondrial (ver Figura 13-10). Os grupos acetilas do acetil-CoA são então oxidados na matriz por meio do ciclo do ácido cítrico (ver Painel 13-2, p. 442-443). O ciclo converte os átomos de carbono do acetil-CoA em CO_2, o qual é liberado pela célula como subproduto. Além disso, o ciclo gera elétrons de alta energia transportados pelas moléculas carreadoras ativadas NADH e $FADH_2$ (**Figura 14-5**).

Embora o ciclo do ácido cítrico seja considerado como parte do metabolismo aeróbio, ele não utiliza oxigênio molecular (O_2). O oxigênio é diretamente consumido somente no final das reações catabólicas que ocorrem na membrana mitocondrial interna.

Um processo quimiosmótico converte em ATP a energia de moléculas carreadoras ativadas

Quase toda a energia disponível da queima de carboidratos, gorduras e outros alimentos nos estágios iniciais da sua oxidação é inicialmente armazenada na forma de moléculas carreadoras ativadas geradas durante a glicólise e o ciclo do ácido cítrico – NADH e $FADH_2$. Essas moléculas carreadoras doam seus elétrons de alta energia para a cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial e, portanto, são oxidadas à NAD^+ e FAD. Os elétrons são rapidamente passados ao longo da cadeia até o oxigênio molecular (O_2) para formar água (H_2O). A energia liberada durante a passagem dos elétrons ao longo da cadeia transportadora é utilizada para bombear prótons através da membrana mitocondrial interna (**Figura 14-6**). O gradiente de prótons resultante, por sua

Figura 14-5 NADH doa seus elétrons para a cadeia transportadora de elétrons. Neste desenho, os elétrons de alta energia são apresentados como dois *pontos vermelhos* em um átomo *amarelo* de hidrogênio. Um íon hidreto (um átomo de hidrogênio com um elétron extra) é removido da NADH e convertido em um próton e dois elétrons de alta energia. Somente o anel que carrega os elétrons em uma ligação de alta energia é demonstrado; para a estrutura completa e a conversão de NAD^+ de volta à NADH, ver a estrutura da molécula de NAD relacionada na Figura 3-34. Os elétrons também são transportados de uma forma semelhante pela $FADH_2$, cuja estrutura é mostrada na Figura 13-12B.

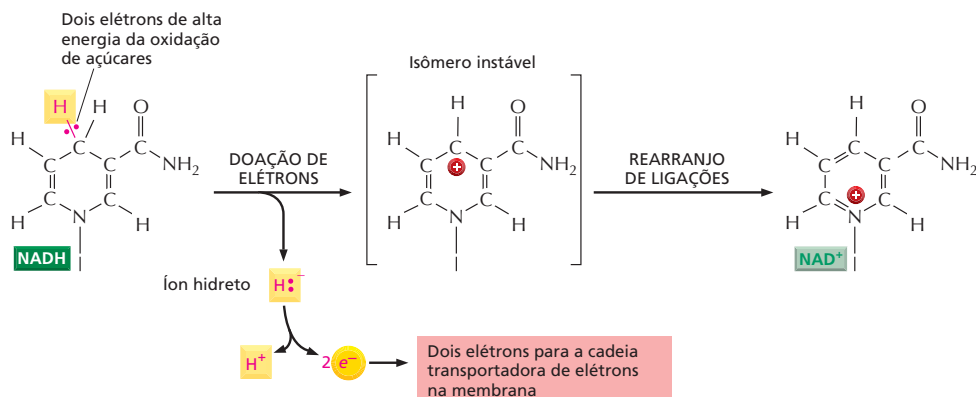
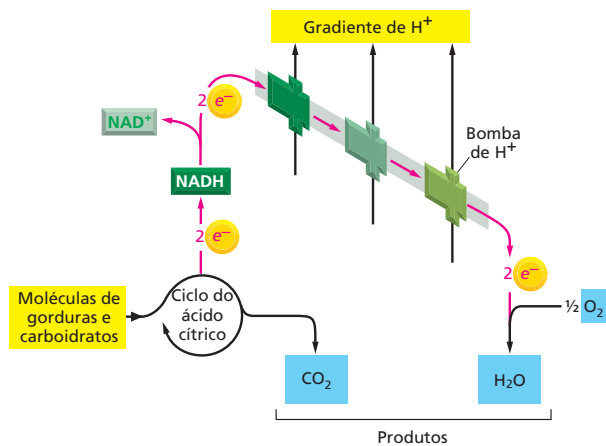



Figura 14-6 Prótons são bombeados através da membrana mitocondrial interna. Somente o estágio 1 do acoplamento quimiosmótico é demonstrado (ver Figura 14-1. A rota do fluxo de elétrons é indicada por *setas vermelhas*.

vez, promove a síntese de ATP. A sequência completa das reações pode ser vista na **Figura 14-7**. Assim, a membrana mitocondrial interna serve como um dispositivo que converte a energia presente nos elétrons de alta energia da NADH em ligações de fosfato de alta energia do ATP (**Figura 14-8**). Esse mecanismo quimiosmótico de síntese do ATP é chamado de **fosforilação oxidativa** porque envolve tanto o consumo de O_2 quanto a síntese de ATP pela adição de um grupo fosfato ao ADP.

Ainda que o acoplamento quimiosmótico não tenha sido descoberto por muitos anos, a maioria dos organismos vivos usa esse mecanismo para gerar ATP. A origem dos elétrons que propulsionam o bombeamento difere largamente entre diferentes organismos e diferentes processos. Na respiração aeróbia das mitocôndrias e em bactérias aeróbias, os elétrons são derivados da glicose ou de ácidos graxos. Na fotossíntese, os elétrons necessários são oriundos da ação da luz sobre o pigmento verde *clorofila*. Muitas bactérias utilizam substâncias inor-

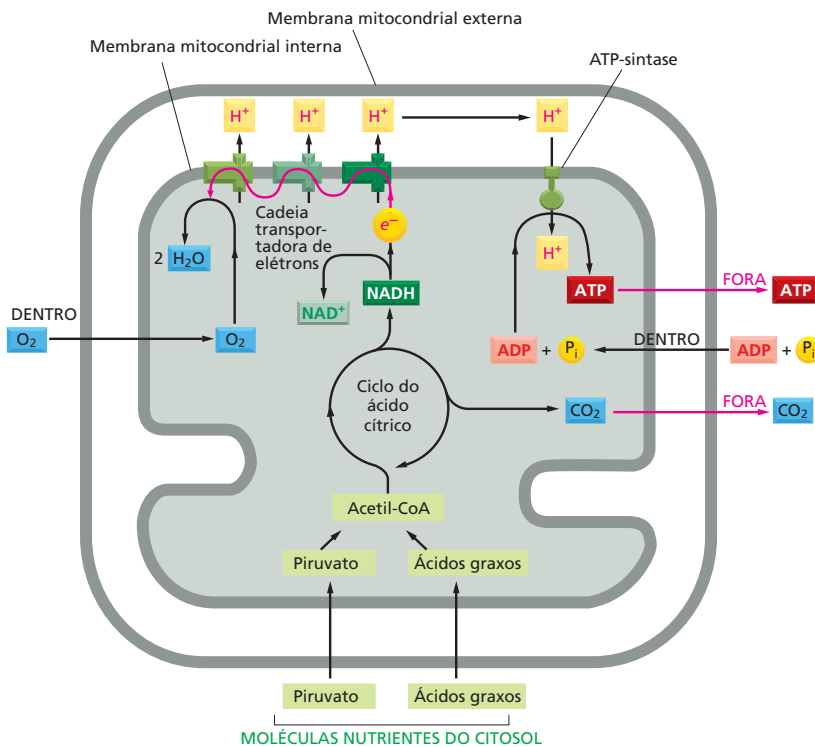



Figura 14-7 Elétrons de alta energia, gerados durante o ciclo do ácido cítrico, propulsionam a síntese de ATP. Piruvato e ácidos graxos entram na mitocôndria *(base)*, são quebrados em acetil-CoA e são então metabolizados pelo ciclo do ácido cítrico, o qual reduz a NAD^+ à NADH (e a FAD^+ à $FADH_2$, não mostrado). No processo de fosforilação oxidativa, elétrons de alta energia da NADH (e $FADH_2$) são transferidos ao longo da cadeia transportadora de elétrons da membrana interna até o oxigênio (O_2). Esse transporte de elétrons gera um gradiente de prótons através da membrana interna, o qual é utilizado para promover a produção de ATP pela ATP-sintase. Nesse diagrama, as razões exatas de "substratos" e "produtos" foram omitidas. Por exemplo, será brevemente visto que são necessários quatro elétrons provenientes de quatro moléculas de NADH para converter O_2 em duas moléculas de H_2O.

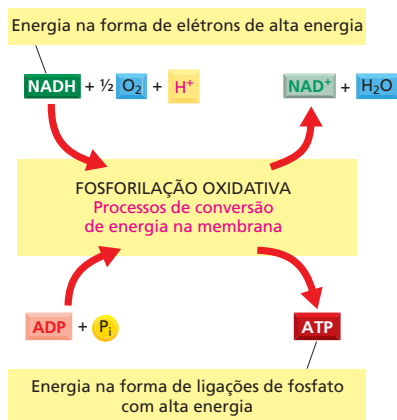



Figura 14-8 As mitocôndrias catalisam a principal conversão de energia. Na fosforilação oxidativa, a energia liberada pela oxidação de NADH para NAD^+ é aproveitada – por processos conversores de energia na membrana – para fornecer a energia necessária para fosforilar o ADP e formar ATP. A equação líquida desse processo, no qual dois elétrons passam da NADH para o oxigênio, é NADH + ½ O_2 + H^+ → NAD^+ + H_2O.

gânicas, como hidrogênio, ferro e enxofre, como fonte de elétrons de alta energia necessários para produzir ATP.

A cadeia transportadora de elétrons bombeia prótons através da membrana mitocondrial interna

A cadeia transportadora de elétrons – ou *cadeia respiratória* – que conduz a fosforilação oxidativa está presente em muitas cópias na membrana mitocondrial interna. Ela possui mais de 40 proteínas, sendo que a maioria dessas proteínas está embebida na bicamada lipídica e funciona somente em uma membrana intacta, tornando difícil o seu estudo. Entretanto, os componentes da cadeia transportadora de elétrons, como outras proteínas de membrana, podem ser solubilizados utilizando-se detergentes não iônicos (ver Figura 11-27), purificados e, então, reconstituídos em uma forma operacional em pequenas vesículas de membranas. Tais estudos revelam que a maioria das proteínas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial está agrupada em três grandes *complexos enzimáticos respiratórios,* cada um contendo múltiplas proteínas individuais. Cada complexo inclui proteínas transmembrânicas que firmemente sustentam todo o complexo na membrana mitocondrial interna.

Os três complexos enzimáticos respiratórios, na ordem em que recebem elétrons, são (1) o *complexo NADH-desidrogenase,* (2) o *complexo do citocromo* b-c_1 e (3) o *complexo citocromo-oxidase.* Cada um contém íons metálicos e outros grupos químicos que formam a rota para a passagem de elétrons através do complexo. Os complexos respiratórios são os sítios do bombeamento de prótons, e cada um pode ser entendido como uma máquina proteica que bombeia prótons através da membrana à medida que elétrons são transferidos por meio dela.

O transporte de elétrons inicia quando um íon hidreto (H^-) é removido da NADH e convertido em um próton e dois elétrons de alta energia: $H^- \rightarrow H^+ + 2e$-, como explicado na Figura 14-5. Essa reação é catalisada pelo primeiro dos complexos enzimáticos respiratórios, a NADH-desidrogenase, a qual é aceptora de elétrons da NADH (**Figura 14-9**). Os elétrons são então transferidos ao longo da cadeia para cada um dos outros complexos enzimáticos, utilizando carreadores de elétrons móveis que transportam os elétrons entre os complexos. A transferência de elétrons através da cadeia é energeticamente favorável: os elétrons iniciam com uma energia muito alta e perdem-na a cada etapa à medida que passam ao longo da cadeia, eventualmente entrando na citocromo-oxidase, onde são combinados com uma molécula de O_2 para formar água. Essa é a etapa dependente de oxigênio da respiração celular, e ela consome quase todo o oxigênio que respiramos.

O bombeamento dos prótons gera um gradiente eletroquímico abrupto de prótons através da membrana interna da mitocôndria

Sem um mecanismo para aproveitar a energia liberada pela transferência de elétrons, essa energia iria simplesmente ser dispensada como calor. Entretanto, as células utilizam grande parte da energia de transferência de elétrons realizando essa transferência no interior de proteínas que são capazes de bombear prótons. Dessa forma, o fluxo energeticamente favorável dos elétrons, ao longo da ca-

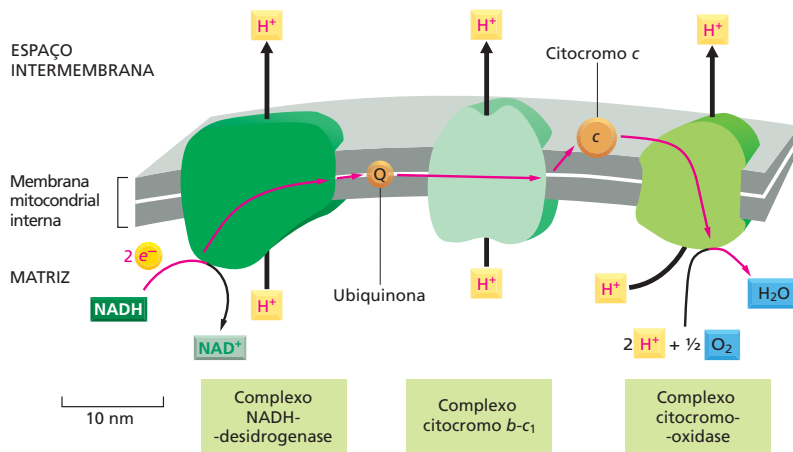



Figura 14-9 Os elétrons são transferidos através de três complexos enzimáticos respiratórios na membrana mitocondrial interna. O tamanho e o formato relativo de cada complexo é demonstrado. Durante a transferência de elétrons da NADH para o oxigênio *(linhas vermelhas)*, prótons derivados da água são bombeados através da membrana, da matriz para o espaço intermembranas, por cada um dos complexos enzimáticos respiratórios (**Animação 14.2**). A ubiquinona (Q) e o citocromo *c* (c) servem como carreadores móveis que transportam os elétrons de um complexo para o próximo.

deia transportadora de elétrons, resulta no bombeamento de prótons, através da membrana, para fora da matriz mitocondrial e para o interior do espaço entre as membranas mitocondriais interna e externa (ver Figura 14-9).

Mais tarde, no capítulo, serão revisados em detalhes os mecanismos moleculares que acoplam o transporte de elétrons ao movimento de prótons. Por enquanto, serão ressaltadas as consequências dessa elegante estratégia biológica. Primeiro, o bombeamento ativo de prótons gera um gradiente de concentração de H^+ – um gradiente de pH – através da membrana interna da mitocôndria, onde o pH é cerca de 0,5 unidades maior na matriz (em torno do pH 7,5) do que no espaço intermembranas (o qual é próximo a 7, o mesmo pH do citosol). Segundo, o bombeamento de prótons gera um potencial de membrana através da membrana mitocondrial interna, com a sua face interna (região da matriz) negativa, e a face externa, positiva, como resultado do fluxo de saída de H^+.

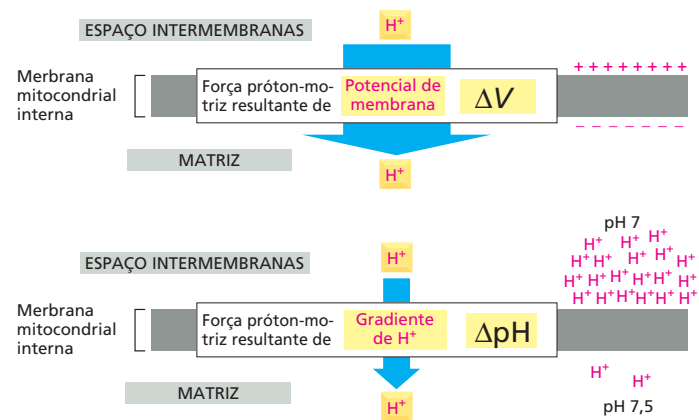
Como discutido no Capítulo 12, a força que promove o fluxo passivo de um íon através de uma membrana é proporcional ao gradiente eletroquímico para o íon através dessa membrana. Esse estado depende da voltagem através da membrana, a qual é medida como potencial de membrana e como gradiente de concentração do íon (ver Figura 12-7). Como os prótons são positivamente carregados, eles se moverão mais rapidamente através de uma membrana se a membrana possuir um excesso de carga elétrica negativa no outro lado. No caso da membrana mitocondrial interna, o gradiente de pH e o potencial de membrana agem juntos para criar um elevado gradiente eletroquímico de prótons, tornando energeticamente muito favorável o fluxo de H^+ de volta para a matriz mitocondrial. Na produção de energia nas membranas, como discutido neste capítulo, o potencial de membrana se soma à força que impulsiona o arraste de retorno do H^+ através da membrana, a qual é denominada *força próton-motriz*. Por essa razão, o potencial de membrana aumenta a quantidade de energia armazenada no gradiente de prótons (**Figura 14-10**).

QUESTÃO 14-3

Quando o fármaco dinitrofenol (DNP) é administrada a mitocôndrias, a membrana interna se torna permeável a prótons (H^+). Em contrapartida, quando o fármaco nigericina é adicionado a mitocôndrias, a membrana interna se torna permeável a K^+. (A) Como o gradiente eletroquímico de prótons irá mudar em resposta ao DNP? (B) Como ele se modificará em resposta à nigericina?

O gradiente de prótons promove a síntese de ATP

Como elucidado anteriormente, o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna é utilizado para promover a síntese de ATP. O dispositivo que torna isto possível é uma grande enzima denominada de **ATP-sintase**, a qual também se encontra embebida na membrana mitocondrial interna. A ATP-sintase cria uma via hidrofílica através da membrana mitocondrial interna que permite aos prótons fluírem de volta através da membrana, a favor do seu gradiente eletroquímico (**Figura 14-11**). À medida que os prótons fazem a sua passagem através da enzima, eles são utilizados para dirigir a reação energeticamente desfavorável entre ADP e P_i para produzir ATP (ver Figura 2-24).

Figura 14-10 O gradiente eletroquímico total de H^+ através da membrana mitocondrial interna consiste em uma grande força resultante do potencial de membrana (ΔV) e uma força menor resultante do gradiente de concentração de H^+ (ΔpH). Ambas as forças combinadas produzem a força próton-motriz total que direciona H^+ para o espaço da matriz. A relação entre essas forças é expressa pela equação de Nernst (ver Figura 12-30).

A ATP-sintase é de origem remota; a mesma enzima ocorre nas mitocôndrias de células animais, de cloroplastos de plantas e algas e na membrana plasmática de bactérias.

A ATP-sintase é uma grande proteína com várias subunidades (Figura 14-12). Uma grande porção enzimática, com o formato semelhante à cabeça de um pirulito, projeta-se para o interior da matriz e realiza a reação de fosforilação. Essa estrutura enzimática está fixada por meio de uma fina "haste" com várias subunidades a um carreador de prótons transmembrânico. À medida que os prótons passam através de um estreito canal dentro do carreador transmembrânico, seu movimento causa uma rotação rápida da haste dentro da cabeça, induzindo a cabeça a produzir ATP (ver Figura 14-12A). A sintase age essencialmente como um motor molecular gerador de energia, convertendo a energia do fluxo de prótons a favor de um gradiente, na energia mecânica de dois conjuntos de proteínas friccionados um contra o outro – proteínas da haste em rotação empurrando proteínas fixas da cabeça. O movimento da haste muda a conformação das subunidades dentro da cabeça. Essa deformação mecânica converte a energia em ligações químicas quando as subunidades produzem o ATP. Esse fantástico dispositivo é capaz de produzir mais de 100 moléculas de ATP por segundo, e a passagem de cerca de três prótons através da sintase é necessária para fazer cada molécula de ATP.

A ATP-sintase é um dispositivo de acoplamento reversível. Ela pode tanto aproveitar o fluxo de prótons a favor do seu gradiente eletroquímico para produzir ATP (sua função normal nas mitocôndrias e nas membranas plasmáticas de bactérias crescendo aerobicamente) quanto utilizar a energia da hidrólise do ATP para bombear prótons pela membrana (Figura 14-13). Do último modo, a ATP-sintase funciona de forma semelhante à bomba de H^+ descrita no Capítulo 12. Se a ATP-sintase primariamente produz ou consome ATP depende da magnitude do

Figura 14-11 O gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna possibilita a síntese de ATP pela ATP-sintase. À medida que um elétron de alta energia passa através da cadeia transportadora de elétrons, grande parte da energia liberada é utilizada para direcionar os três complexos enzimáticos respiratórios que bombeiam H^+ para fora do espaço da matriz. O gradiente eletroquímico de prótons resultante, através da membrana interna, direciona H^+ de volta pela ATP-sintase, um complexo proteico transmembrânico que utiliza a energia do fluxo de H^+ para sintetizar ATP a partir de ADP e P_i na matriz.

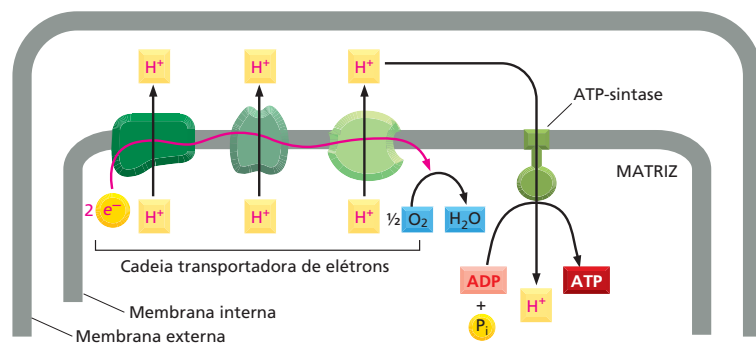
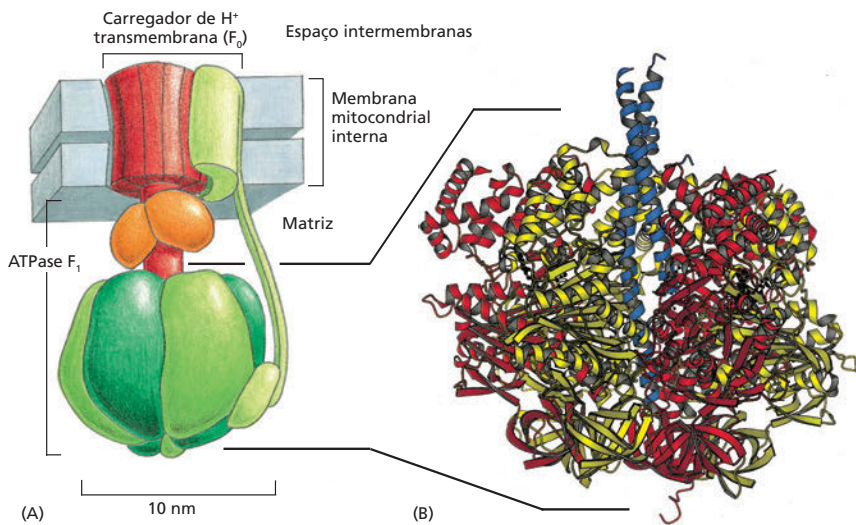



Figura 14-12 A ATP-sintase possui a forma semelhante a um pirulito. (A) A enzima é composta de uma porção "cabeça", denominada de F_1 ATPase, e de um carreador de H^+ transmembrânico, denominado F_0. Tanto F_1 quanto F_0 são formados de múltiplas subunidades, como indicado. A porção F_0, que consiste em um rotor e em uma haste (*vermelho*), gira na membrana impulsionada pelo gradiente de prótons. O estator *(verde-claro)* é formado pelas subunidades transmembrânicas ligadas a outras subunidades criando um braço longo. Esse braço fixa o estator a um anel de subunidades que formam a cabeça estacionária da ATPase. Sua subunidade β (*verde-escuro*) gera ATP. (B) Estrutura tridimensional da F_1 ATPase, como determinada por cristalografia por raios X. Essa parte da ATP-sintase deriva seu nome da sua habilidade de conduzir a reação inversa à síntese de ATP, isto é, a hidrólise de ATP em ADP e P_i, quando destacada da porção transmembrânica. (B, cortesia de John Walker, de J.P. Abrahams *et al.*, *Nature* 370:621-628, 1994. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

gradiente eletroquímico de prótons através da membrana na qual ela está. Em muitas bactérias que podem crescer tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias a direção na qual funciona a ATP-sintase é rotineiramente revertida quando a bactéria fica sem O_2. Nesse ponto, a ATP-sintase utiliza parte do ATP gerado no interior da célula pela glicólise para bombear prótons para fora da célula, criando um gradiente de prótons que a célula bacteriana necessita para importar seus nutrientes essenciais por transporte acoplado, como será visto a seguir.

O transporte acoplado através da membrana mitocondrial interna é também promovido pelo gradiente eletroquímico de prótons

A síntese de ATP não é o único processo promovido pelo gradiente eletroquímico de prótons. Nas mitocôndrias, muitas moléculas com carga, como piruvato, ADP e P_i, são bombeadas para a matriz a partir do citosol, enquanto outras, como ATP, devem ser carreadas na direção oposta. Proteínas carreadoras que se ligam a essas moléculas podem acoplar o seu transporte ao fluxo energeticamente favorável de H^+ para a matriz mitocondrial. Por exemplo, o piruvato e o fosfato inorgânico (P_i) são cotransportados para dentro junto com H^+, à medida que esse último se move para a matriz.

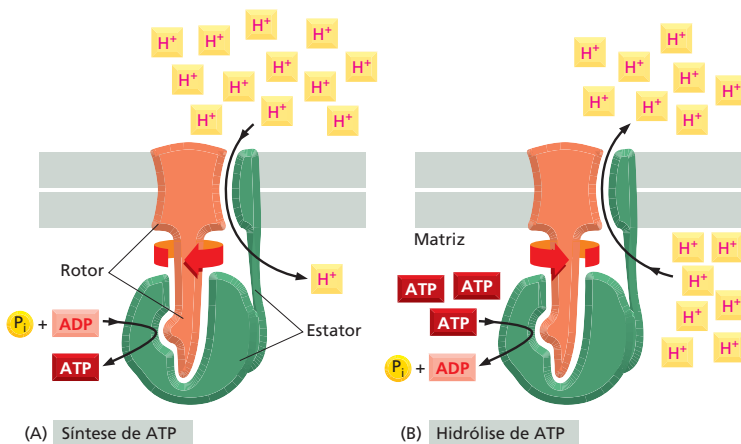



Figura 14-13 A ATP-sintase é um dispositivo reversível de acoplamento que pode converter a energia do gradiente eletroquímico de prótons em energia de ligações químicas, ou vice-versa. A ATP-sintase pode tanto sintetizar ATP aproveitando o gradiente de H^+ (A) quanto bombear prótons contra o seu gradiente eletroquímico pela hidrólise de ATP (B). A direção de operação em um dado momento depende do lucro líquido em energia livre (Δ*G*, discutido no Capítulo 3) para os processos acoplados de translocação de H^+ através da membrana e da síntese de ATP a partir de ADP e P_i. Por exemplo, se o gradiente eletroquímico de prótons cair abaixo de um certo nível, a Δ*G* para o transporte de H^+ para o interior da matriz não será grande o bastante para promover a produção de ATP. Ao contrário, o ATP será hidrolisado pela ATP-sintase para reconstituir o gradiente. O funcionamento da ATP-sintase é apresentado nas **Animações 14.3** e **14.4**.

QUESTÃO 14-4

A propriedade marcante que faz com que a ATP-sintase possa funcionar em qualquer direção permite a interconversão, em uma ou outra direção, da energia armazenada no gradiente de H^+ ou a energia armazenada no ATP. (A) Se a ATP-sintase, produtora de ATP, fosse comparada a uma turbina hidrelétrica, produtora de energia elétrica, qual seria a analogia adequada quando ela funcionar na direção oposta? (B) Sob certas condições, poderia esperar-se que a ATP-sintase parasse, não girando nem para frente nem para trás? (C) O que determina a direção de operação da ATP-sintase?

Outros transportadores aproveitam a vantagem do fato de que o gradiente eletroquímico de prótons gera um potencial de ação na membrana, de tal forma que a membrana mitocondrial interna é mais negativamente carregada do que o espaço intermembrana do outro lado. Uma proteína carreadora antiporte aproveita esse gradiente de voltagem para expulsar ATP – e importar ADP – da matriz mitocondrial. Como a molécula de ATP possui uma carga negativa a mais do que o ADP, a permuta desse nucleotídeo resulta no movimento de uma carga negativa para fora da mitocôndria. Essa troca de nucleotídeos – a qual envia ATP para o citosol – é assim promovida pela diferença de carga através da membrana mitocondrial interna (**Figura 14-14**).

Consequentemente, o gradiente eletroquímico de prótons em células eucarióticas é utilizado tanto para promover a formação de ATP quanto para transportar certos metabólitos através da membrana mitocondrial interna. Em bactérias, o gradiente de prótons pela membrana plasmática serve para todas essas funções. No entanto, nas bactérias, esse gradiente também é uma importante fonte de energia diretamente utilizável: em bactérias móveis, um fluxo de prótons para o interior da célula promove a rápida rotação do flagelo bacteriano, o qual propulsiona a bactéria no ambiente (**Animação 14.5**).

A fosforilação oxidativa produz a maior parte do ATP celular

Como discutido, a glicólise sozinha produz, como resultado líquido, duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose, e a completa oxidação da glicose – a qual inclui a glicólise e a oxidação – gera cerca de 30 ATPs. Na glicólise, é óbvio de onde provêm essas moléculas de ATP: duas moléculas de ATP são consumidas inicialmente no processo, e quatro moléculas de ATP são produzidas próximo ao final (ver Figura 13-3). Contudo, para a fosforilação oxidativa, a conta é menos direta, porque os ATPs não são produzidos diretamente como na glicólise. Ao contrário, eles são produzidos a partir da energia carreada por NADH e $FADH_2$, as quais são geradas durante a glicólise e durante o ciclo do ácido cítrico. Essas moléculas carreadoras ativadas doam seus elétrons para a cadeia de transporte de elétrons que se encontra na membrana mitocondrial interna. O movimento desses elétrons ao longo da cadeia respiratória abastece a formação do gradiente de prótons, o qual impulsiona a formação de ATP.

A quantidade máxima de ATP que cada molécula carreadora produz depende de vários fatores, incluindo o local em que os seus elétrons entram na

Figura 14-14 O gradiente eletroquímico de prótons pela membrana mitocondrial interna é também usado para conduzir alguns processos acoplados ao transporte. O piruvato e o fosfato inorgânico (P_i) são transportados para a matriz junto com íons H^+ quando esses se movem a favor do seu gradiente eletroquímico. O ADP é bombeado para o interior, e o ATP, para o exterior por um processo antiporte (troca ADP-ATP) que depende de um gradiente de voltagem da membrana (potencial de membrana). A carga de cada molécula transportada está indicada em comparação com o potencial de membrana, o qual é negativo internamente. A membrana externa é livremente permeável a todos esses compostos. O transporte ativo de moléculas através de membranas por proteínas carreadoras e a formação do potencial de membrana são discutidos no Capítulo 12.

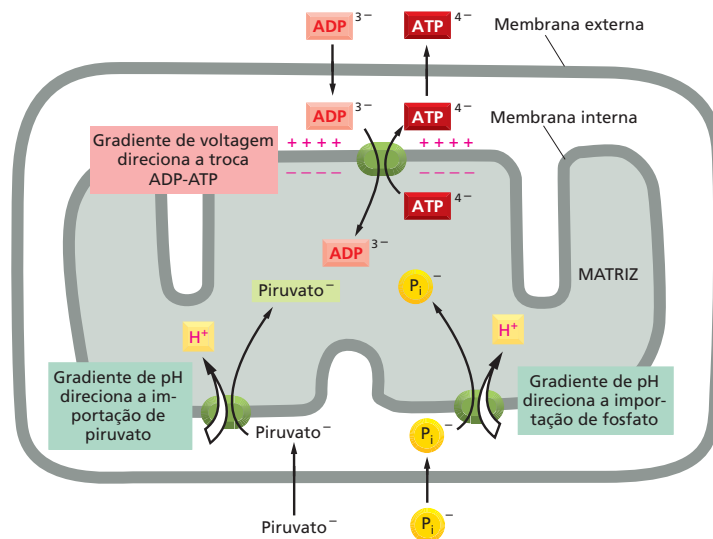



TABELA 14-1 Produtos gerados a partir da oxidação da glicose

Processo	Produto direto	Produção final de ATP por molécula de glicose
Glicólise	2 NADH (citosólico)	3*
	2 ATP	2
Oxidação do piruvato à acetil-CoA (duas por glicose)	2 NADH (matriz mitocondrial)	5
Oxidação completa de acetil-CoA (duas por glicose)	6 NADH (matriz mitocondrial)	15
	2 $FADH_2$	3
	2 GTP	2
	TOTAL	30

*A NADH produzida no citosol forma menos moléculas de ATP do que a NADH produzida na matriz mitocondrial, pois a membrana mitocondrial interna é impermeável à NADH. Assim, o transporte da NADH para o interior da matriz mitocondrial – onde ela encontra a NADH-hidrogenase – necessita de energia.

cadeia respiratória. As moléculas de NADH produzidas durante o ciclo do ácido cítrico, o qual ocorre no interior das mitocôndrias, transferem seus elétrons para a NADH-desidrogenase – o primeiro complexo enzimático da cadeia respiratória. Então, esses elétrons passam de um complexo enzimático para o próximo, promovendo o bombeamento de prótons pela membrana mitocondrial interna, em cada etapa ao longo do caminho. Essas moléculas de NADH fornecem energia para a formação final de cerca de 2,5 moléculas de ATP (ver Questão 14-5 e sua resposta).

Por outro lado, a $FADH_2$ produz um ganho líquido de 1,5 molécula de ATP durante o ciclo do ácido cítrico. Isso ocorre porque a molécula de $FADH_2$ evita o complexo NADH-desidrogenase, transferindo os seus elétrons para o carreador móvel ubiquinona (ver Figura 14-9). Esses elétrons entram mais abaixo na cadeia respiratória, promovendo um menor bombeamento de prótons e gerando menos ATP. A **Tabela 14-1** possibilita um cálculo completo do ATP produzido pela oxidação de cada molécula de glicose.

A oxidação de ácidos graxos também produz grandes quantidades de NADH e $FADH_2$, as quais induzem a formação de grandes quantidades de ATP por meio da fosforilação oxidativa (ver Figuras 13-9 e 13-10). Assim, a grande maioria do ATP produzido em uma célula animal é gerado pelo mecanismo quimiosmótico na membrana mitocondrial.

QUESTÃO 14-5

Calcule o número de moléculas de ATP produzidas por par de elétrons transferidos da NADH ao oxigênio se (i) cinco prótons são bombeados através da membrana mitocondrial interna para cada elétron passado pelos três complexos enzimáticos respiratórios; (ii) três prótons devem passar através da ATP-sintase para cada molécula de ATP produzida a partir de ADP e fosfato inorgânico dentro da mitocôndria; (iii) um próton é utilizado para produzir o gradiente de voltagem necessário para o transporte de cada molécula de ATP para fora da mitocôndria para o citosol onde é utilizada.

A rápida conversão de ADP em ATP nas mitocôndrias mantém uma alta razão ATP:ADP nas células

Como resultado do processo de cotransporte discutido, as moléculas de ADP produzidas pela hidrólise do ATP no citosol são rapidamente devolvidas para o interior das mitocôndrias para serem recarregadas, e as moléculas de ATP são rapidamente bombeadas para o citosol, onde são necessárias. Uma pequena parte desse ATP é usada pela própria mitocôndria, provendo energia para a replicação de seu DNA, síntese proteica e outras reações que consomem energia. No total, uma molécula típica de ATP do corpo humano é transportada para fora da mitocôndria e retorna a ela (como ADP) para ser recarregada mais de uma vez por minuto, mantendo a concentração de ATP na célula cerca de 10 vezes mais alta do que a de ADP.

Como discutido no Capítulo 3, as enzimas biossintéticas, com frequência, realizam reações energeticamente desfavoráveis pelo acoplamento dessas reações à hidrólise energeticamente favorável do ATP (ver Figura 3-33A). O estoque

de ATP é utilizado para promover os processos celulares de forma muito semelhante a uma bateria que propulsiona aparelhos elétricos. Se a atividade das mitocôndrias fosse impedida, os níveis de ATP cairiam, e a bateria celular terminaria; algumas vezes, reações energeticamente desfavoráveis não poderiam mais ocorrer, e a célula morreria. O veneno cianeto, o qual bloqueia o transporte de elétrons na membrana mitocondrial interna, causa a morte exatamente por esse processo.

MECANISMO MOLECULAR DO TRANSPORTE DE ELÉTRONS E DO BOMBEAMENTO DE PRÓTONS

Foi considerado, em termos gerais, como uma mitocôndria acopla o transporte de elétrons a geração de ATP. Agora, será examinado com maior detalhe o mecanismo molecular que está por trás do processo de conversão energética com base na membrana. Fazendo isso, estaremos alcançando um propósito maior. Como enfatizado no início deste capítulo, mecanismos de conversão de energia muito semelhantes são empregados por mitocôndrias, cloroplastos e bactérias, e os princípios básicos que discutiremos a seguir fundamentam, portanto, o funcionamento de aproximadamente todos os seres vivos.

Durante muitos anos, o fato de as cadeias transportadoras de elétrons estarem embebidas em membranas iludiu os bioquímicos que exaustivamente tentavam entendê-las. O processo de acoplamento quimiosmótico acarreta uma interação entre as forças química e elétrica, que não é fácil de decifrar em nível molecular. O quebra-cabeça foi solucionado tão logo a função fundamental dos gradientes transmembrânicos de prótons na geração de energia foi proposto no início da década de 1960. Entretanto, a ideia era tão inovadora que não foi amplamente aceita até muitos anos mais tarde, após o acúmulo de evidências adicionais, a partir de experimentos planejados para testar a hipótese quimiosmótica (ver **Como Sabemos**, p. 468-469).

Embora os investigadores da atualidade estejam ainda revelando muitos dos detalhes do acoplamento quimiosmótico em nível atômico, os fundamentos estão claros hoje. Nesta parte do capítulo, serão observados alguns dos princípios que fundamentam os processos de transporte de elétrons, explicando como eles podem gerar um gradiente de prótons.

Os prótons são prontamente movidos pela transferência de elétrons

Embora os prótons se assemelhem a outros íons positivos, como Na^+ e K^+, no seu movimento pelas membranas, eles são únicos em outros aspectos. Os átomos de hidrogênio são disparadamente os mais abundantes tipos de átomos em organismos vivos e estão presentes em profusão não somente nas moléculas biológicas que contêm carbono, mas também nas moléculas de água que as cercam. Os prótons na água são altamente móveis, agitando-se pela rede de pontes de hidrogênio das moléculas de água pela rápida dissociação de uma molécula de água de forma a associar-se com a vizinha. Assim, a água, que está por toda a célula, serve como um reservatório imediato para a doação e a acepção de prótons.

Sempre que uma molécula é reduzida pela aquisição de um elétron, o elétron (e^-) traz consigo uma carga negativa. Em muitos casos, essa carga é rapidamente neutralizada pela adição de um próton da água, de forma que o efeito líquido da redução é a transferência de um átomo inteiro de hidrogênio, $H^+ + e^-$ (**Figura 14-15**). Similarmente, quando uma molécula é oxidada, o átomo de hidrogênio pode ser rapidamente dissociado em seus elétrons e prótons constituintes, permitindo que o elétron seja transferido separadamente para uma molécula capaz de aceitar elétrons, ao passo que o próton é deslocado

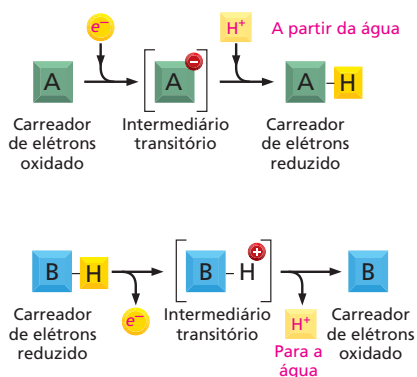



Figura 14-15 Os prótons na água são bastante móveis. A transferência de elétrons pode causar a transferência de átomos inteiros de hidrogênio, porque os prótons são prontamente captados ou doados pela água intracelular. Neste exemplo, *A* capta um elétron somado a um próton quando é reduzido, e *B* perde um elétron e um próton quando oxidado.

Figura 14-16 A orientação dos carreadores de elétrons possibilita que a transferência de elétrons propulsione o bombeamento de prótons. À medida que um elétron passa através de uma cadeia transportadora de elétrons, ele pode ligar-se e liberar um próton em cada etapa. Nesse diagrama esquemático, o carreador de elétrons B capta um próton (H^+) de um lado da membrana quando aceita um elétron (e^-) do carreador A; ele libera o próton do outro lado da membrana quando doa o seu elétron para o carreador C.

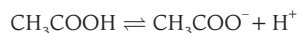
para a água. Portanto, em uma membrana na qual os elétrons são levados ao longo de uma cadeia transportadora de elétrons, é um problema relativamente simples, em princípio, bombear prótons de um lado para outro da membrana. Tudo o que se requer é que um carreador de elétrons esteja arranjado na membrana de forma que possa pegar um próton de um lado da membrana, quando esse recebe um elétron, enquanto libera o próton do outro lado da membrana, quando o elétron é transferido para a próxima molécula carreadora da cadeia (**Figura 14-16**).

O potencial redox é uma medida das afinidades eletrônicas

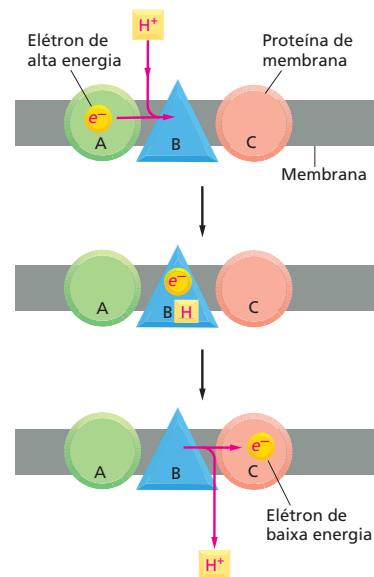
As proteínas da cadeia respiratória direcionam os elétrons de forma que eles são sequencialmente movidos de um complexo enzimático para outro – sem curto-circuito que saltam um complexo. Cada elétron é transferido em uma reação de oxidação-redução: como descrito no Capítulo 3, a molécula ou o átomo doador de elétron se torna oxidado, e a molécula ou o átomo que recebe se torna reduzido (ver p. 187-188). Os elétrons serão transferidos espontaneamente de uma molécula que tenha uma relativa baixa afinidade por seus elétrons disponíveis e, assim, possam perdê-los facilmente para moléculas com uma maior afinidade por elétrons. Por exemplo, a NADH com seus elétrons de alta energia possuem uma baixa afinidade por elétrons; então, seus elétrons são rapidamente transferidos para a NADH-desidrogenase. Semelhantemente, as baterias elétricas comuns se baseiam em transferências de elétrons entre duas substâncias químicas com diferentes afinidades.

Nas reações bioquímicas, quaisquer elétrons removidos de uma molécula são transferidos para outra, de modo que a oxidação de uma molécula determina a redução de outra. Semelhantemente a qualquer outra reação química, a tendência de tal oxidação-redução, ou **reações redox**, de ocorrer espontaneamente depende da variação de energia livre (ΔG) para a transferência de elétrons, a qual depende, por sua vez, das afinidades relativas das duas moléculas por elétrons. (O papel da energia livre nas reações químicas é discutido no Capítulo 3, p. 91-92.)

Como as transferências de elétrons fornecem a maior parte da energia para os organismos vivos, é importante despender um pouco mais de tempo para entendê-las. Muitos leitores já estão familiarizados com ácidos e bases, os quais doam e aceitam prótons (ver Painel 2-2, p. 66-67). Os ácidos e as bases existem em pares conjugados ácido-base, onde o ácido é prontamente convertido na base pela perda de um próton. Por exemplo, o ácido acético (CH_3COOH) é convertido em sua base conjugada (CH_3COO^-) na reação:

$$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$$

Exatamente da mesma forma, pares de compostos, como NADH e NAD^+, são chamados de **pares redox**, uma vez que NADH é convertida à NAD^+ pela perda de um elétron na reação:

$$NADH \rightleftharpoons NAD^+ + H^+ + 2e^-$$

A NADH é um forte doador de prótons: como os seus elétrons são mantidos por uma ligação de alta energia, a ΔG para a passagem dos seus elétrons para muitas outras moléculas é favorável. Contrariamente, é difícil formar uma ligação de alta energia, e seu par NAD^+ é, necessariamente, um fraco aceptor de elétrons.

COMO SABEMOS:

COMO O ACOPLAMENTO QUIMIOSMÓTICO CONDUZ A SÍNTESE DE ATP

Em 1861, Louis Pasteur descobriu que células de levedura crescem e se dividem com mais vigor na presença de ar, a primeira demonstração de que o metabolismo aeróbio é mais eficiente do que o metabolismo anaeróbio. Suas observações fazem sentido hoje, quando sabemos que a fosforilação oxidativa é um meio muito mais eficiente de gerar ATP do que a glicólise: sistemas transportadores de elétrons produzem cerca de 30 moléculas de ATP para cada molécula de glicose oxidada, comparado com as duas moléculas de ATP geradas pela glicólise sozinha. Entretanto, levaram outros 100 anos para que os pesquisadores determinassem que o processo de acoplamento quimiosmótico – usando bombeamento de prótons para prover energia para a síntese de ATP – permite às células gerar energia com tal eficiência.

Intermediários imaginários

Na década de 1950, muitos pesquisadores acreditavam que a fosforilação oxidativa que ocorre nas mitocôndrias gerava ATP por meio de um mecanismo semelhante ao que é usado na glicólise. Durante a glicólise, o ATP é produzido quando uma molécula de ADP recebe um grupo fosfato diretamente de um intermediário de alta energia. Tal fosforilação em nível de substrato ocorre nas etapas 7 e 10 da glicólise, onde os grupos fosfato de alta energia do 1,3-bifosfoglicerato e do fosfoenolpiruvato são transferidos para ADP para formar ATP (veja Painel 13-1, p. 430-431). Acreditava-se que a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias geraria de forma semelhante algum intermediário de alta energia que poderia então doar seu grupo fosfato diretamente para ADP. Esse modelo inspirou uma procura frustrante por esse misterioso intermediário que durou anos. Investigadores ocasionalmente alegavam ter descoberto o intermediário procurado, mas os compostos se revelavam ou não relacionados ao transporte de elétrons, ou, como um pesquisador colocou em uma revisão da história da bioenergética, "produtos da imaginação de alta energia".

Capturando a força

Foi somente em 1961 que Peter Mitchell sugeriu que o "intermediário de alta energia" que seus colegas procuravam era, na verdade, o gradiente eletroquímico de prótons gerado pelo sistema de transporte de elétrons. Sua proposta, intitulada a hipótese quimiosmótica, propõe que a energia de um gradiente de H^+ formada durante a transferência de elétrons através da cadeia de transporte seria utilizada para gerar a síntese de ATP.

Diversas linhas de evidência oferecem suporte a tal acoplamento quimiosmótico. Primeiro, as mitocôndrias de fato geram um gradiente de prótons através da membrana interna. Entretanto, o que faz esse gradiente? Se o gradiente eletroquímico de H^+ (também chamado de força próton-motriz) é necessário para conduzir a síntese de ATP, como a hipótese quimiosmótica postula, então a destruição desse gradiente – ou da própria membrana – deve inibir a geração de energia. De fato, pesquisadores verificaram que isso é verdade. O rompimento físico da membrana mitocondrial interna cessa a síntese de ATP. De forma semelhante, a dissipação do gradiente de prótons por agentes químicos que causam o "desacoplamento", como 2,4-dinitrofenol (DNP), também impede a formação de ATP. Esses produtos químicos que destroem o gradiente se inserem na membrana mitocondrial interna, onde agem como carreadores de H^+, provendo uma rota para o fluxo de H^+ que evita a síntese de ATP (**Figura 14-17**). Dessa forma, eles desacoplam o transporte de elétrons da síntese de ATP. Como resultado desse curto-circuito, a força próton-motriz é dissipada completamente, e o ATP não pode mais ser formado.

Tal desacoplamento ocorre naturalmente em algumas células adiposas especializadas. Nessas células, chamadas de *células adiposas marrons*, a maioria da energia da oxidação é dissipada como calor, em vez de convertida em ATP. As membranas internas das grandes mitocôndrias dessas células contêm uma proteína de transporte especial que permite que os prótons se movam de acordo com seu gradiente eletroquímico, burlan-

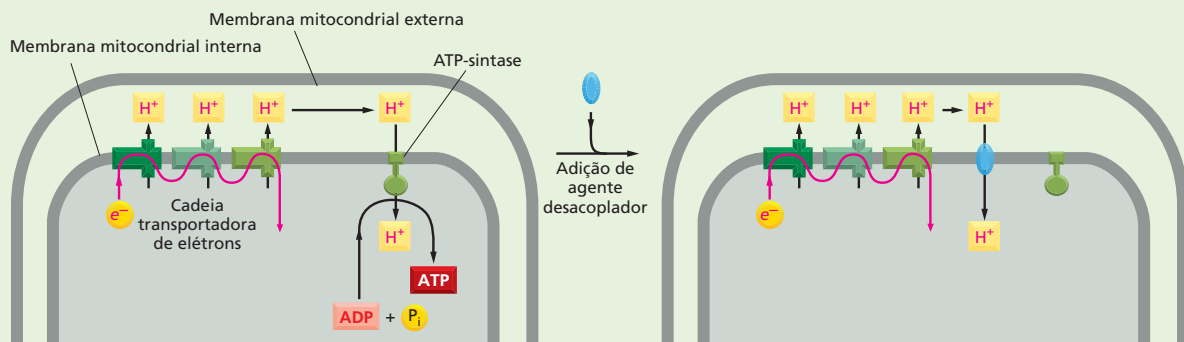
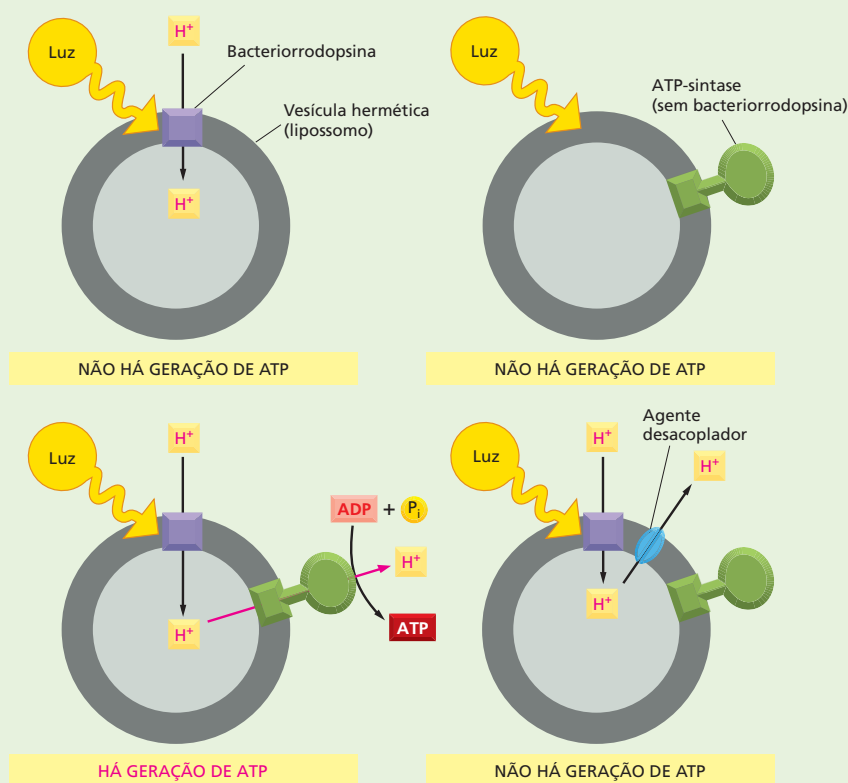



Figura 14-17 **Agentes desacopladores são carreadores de H^+ que podem inserir-se na membrana mitocondrial interna.** Eles tornam a membrana permeável a prótons, permitindo o fluxo de H^+ para dentro da mitocôndria sem passar pela ATP-sintase. Esse curto-circuito desacopla o transporte de elétrons da síntese eficiente do ATP.

Figura 14-18 Experimentos com bacteriorrodopsina e uma ATP-sintase de mitocôndria de coração bovino forneceram forte evidência de que os gradientes de prótons podem fornecer energia para a produção de ATP. Quando bacteriorrodopsina é adicionada a vesículas artificiais, a proteína gera um gradiente de prótons em resposta à luz. Em vesículas artificiais contendo bacteriorrodopsina e uma ATP-sintase, esse gradiente de prótons leva à formação de ATP. Agentes desacopladores que abolem o gradiente eliminam a síntese de ATP.

do a síntese de ATP. Como resultado, as células oxidam seus estoques de gordura rapidamente e produzem mais calor do que ATP. Tecidos contendo gordura marrom servem como aquecedores biológicos, ajudando a reavivar animais hibernantes e a proteger áreas sensíveis de bebês humanos recém-nascidos (como as costas dos seus pescoços) do frio.

Geração artificial de energia

Rompendo-se o gradiente de prótons através da membrana mitocondrial, abole-se a síntese de ATP; então, ao contrário, a geração de um gradiente de prótons artificial deveria estimular a produção de ATP. Novamente, isso é o que acontece. Quando um gradiente de H^+ é imposto artificialmente baixando o pH no lado citoplasmático da membrana mitocondrial, o ATP é sintetizado, mesmo na ausência de substratos oxidáveis.

Como esse gradiente de prótons gera a produção de ATP? É aí que entra a ATP-sintase. Em 1974, Efraim Racker e Walther Stoeckenius demonstraram com precisão que a combinação de uma ATP-sintase mais um gradiente de prótons produz ATP. Esses pesquisadores descobriram que poderiam reconstituir um completo sistema artificial de geração de energia pela combinação de ATPase de mitocôndria de coração bovino com uma proteína da membrana púrpura do procarioto *Halobacterium halobium.* Como discutido no Capítulo 11, a membrana plasmática dessa arqueobactéria é empacotada com bacteriorrodopsina, uma proteína que bombeia H^+ para fora da célula em resposta à luz do sol (ver Figura 11-28). Dessa forma, a proteína púrpura de membrana gera um gradiente de prótons quando exposta à luz do sol.

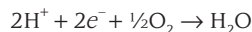
Quando a bacteriorrodopsina foi reconstituída em vesículas lipídicas artificiais, Racker e Stoeckenius mostraram que em presença de luz ela bombeia H^+ para dentro das vesículas, gerando um gradiente de prótons. (Por alguma razão, a orientação da proteína é invertida nessas membranas, de forma que íons H^+ são transportados para dentro das vesículas; nas bactérias, os prótons são bombeados para fora.) Quando uma ATPase purificada de mitocôndria é incorporada a essas vesículas, o sistema catalisa a síntese de ATP em resposta à luz. Essa formação de ATP requer o gradiente de H^+, uma vez que os pesquisadores descobriram que a eliminação da bacteriorrodopsina do sistema ou a adição de agentes desacopladores abole a síntese de ATP (**Figura 14-18**).

Então, ainda que a hipótese de Mitchell tenha inicialmente encontrado considerável resistência – os bioquímicos esperavam descobrir um intermediário de alta energia, em vez de ter de considerar uma ardilosa força eletroquímica –, a evidência experimental que finalmente se acumulou sustentando a importância do acoplamento quimiosmótico na geração de energia celular não poderia ser ignorada, e Mitchell recebeu o Prêmio Nobel em 1978.

A tendência de transferir elétrons em qualquer par redox pode ser medida experimentalmente. Tudo o que é requerido é a formação de um circuito elétrico que ligue uma mistura 1:1 (equimolar) de pares redox a um segundo par redox selecionado arbitrariamente como padrão de referência, de forma que a diferença de voltagem possa ser medida entre eles (Painel 14-1, p. 471). Essa diferença de voltagem é definida como **potencial redox**; como definido, os elétrons irão fluir espontaneamente de um par redox como $NADH/NAD^+$ com um baixo potencial redox (uma baixa afinidade por elétrons) para um par redox como O_2/H_2O com um alto potencial redox (uma alta afinidade por elétrons). Portanto, a NADH é uma boa molécula para doar elétrons para a cadeia respiratória, e O_2 é bem apropriado para atuar como "escoadouro" de elétrons ao final da via. Como explicado no Painel 14-1, a diferença no potencial redox, $\Delta E'_0$' é uma medida direta da variação de energia livre padrão (ΔG^o) para a transferência de um elétron de uma molécula para outra. De fato, $\Delta E'_0$ é simplesmente igual a ΔG^o vezes um número negativo que é uma constante.

As transferências de elétrons liberam grandes quantidades de energia

Como discutido há pouco, aqueles pares de compostos que possuem os potenciais redox mais negativos têm afinidades mais fracas por elétrons e, portanto, contêm carreadores com tendências mais fortes a doar elétrons. Contrariamente, os que possuem potenciais redox mais positivos têm afinidades mais fortes por elétrons e, portanto, a tendência mais forte por aceitá-los. Uma mistura 1:1 de NADH e NAD^+ possui um potencial redox de –320 mV, indicando que a NADH tende a doar elétrons; uma mistura 1:1 de H_2O e $\frac{1}{2}O_2$ possui um potencial redox de +820 mV, indicando que o O_2 é capaz de aceitar elétrons. A diferença no potencial redox é de 1,14 volts (1.140 mV), o que significa que a transferência de cada elétron da NADH para o O_2 sob essas condições-padrão é enormemente favorável, onde $\Delta G^o = -26{,}2$ kcal/mol ou –52,4 kcal/mol para os dois elétrons transferidos por molécula de NADH (ver Painel 14-1). Se compararmos essa variação de energia livre com aquela para a formação da ligação amidridofosfórica no ATP ($\Delta G^o = +7{,}3$ kcal/ mol; ver Figura 13-7), veremos que, pela oxidação de uma molécula de NADH, é liberada energia mais do que suficiente para sintetizar várias moléculas de ATP a partir de ADP e Pi.

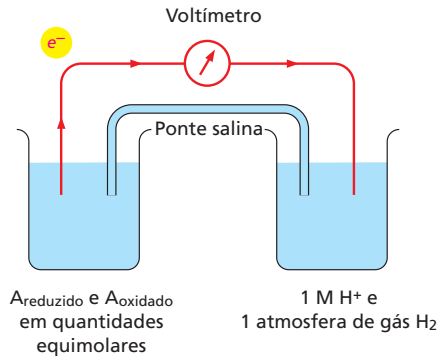
Os sistemas vivos certamente poderiam ter desenvolvido enzimas que permitissem à NADH doar elétrons diretamente para o O_2 para produzir água na reação:

$$2H^+ + 2e^- + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$$

Entretanto, em virtude da brusca queda de energia livre, essa reação procederia com uma força quase explosiva, e aproximadamente toda a energia seria liberada na forma de calor. Ao contrário, a reação energeticamente favorável $2H^+ + 2e^- + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$ é realizada em várias pequenas etapas, permitindo que aproximadamente a metade da energia liberada seja armazenada, em vez de ser perdida para o ambiente como calor.

Os metais fortemente ligados a proteínas formam carreadores versáteis de elétrons

Dentro de cada um dos três complexos enzimáticos respiratórios, os elétrons se movem principalmente entre átomos de metais que estão firmemente ligados às proteínas, e os elétrons viajam aos saltos entre um íon metálico e o próximo, dentro de uma afinidade crescente por elétrons. Em contrapartida, os elétrons são carreados entre os diferentes complexos respiratórios por moléculas que se difundem ao longo da bicamada lipídica, captando elétrons de um complexo e entregando-os ao próximo, em uma sequência ordenada. Tanto na cadeia respiratória quanto na cadeia fotossintética de transporte de elétrons, um desses carreadores é uma **quinona**, uma pequena molécula hidrofóbica fundida

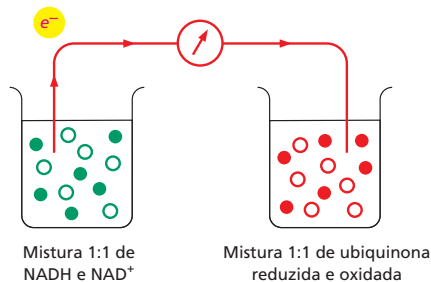
PAINEL 14-1 Potenciais redox

COMO OS POTENCIAIS REDOX SÃO MEDIDOS

Um béquer (*esquerda*) contém a substância A em uma mistura equimolar dos membros reduzido ($A_{reduzido}$) e oxidado ($A_{oxidado}$) do seu par redox. O outro béquer contém o padrão hidrogênio de referência ($2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2$), cujo potencial redox é arbitrariamente assumido como sendo zero por acordo internacional. (Uma ponte salina formada por uma solução concentrada de KCl permite que os íons K^+ e Cl^- se movam entre os dois béquers, como requerido para neutralizar as cargas em cada béquer quando elétrons fluem entre eles.) O cabo metálico (*vermelho*) propicia um caminho livre de resistências para elétrons, e um voltímetro mede o potencial redox da substância A. Se elétrons fluem de $A_{reduzido}$ para H^+, como aqui indicado, entende-se que o par redox formado pela substância A possui um potencial redox negativo. Se eles, ao contrário, fluírem do H_2 para $A_{oxidado}$, esse par redox terá um potencial redox positivo.

Por convenção, o potencial redox para um par redox é designado por *E*. Uma vez que as reações biológicas ocorrem em pH 7, os biólogos definem como condição-padrão $A_{reduzido} = A_{oxidado}$ e $H^+ = 10^{-7}$ e usam isso para determinar o potencial redox padrão E'_0.

Exemplos de reação redoz	Potencial redox E'_0
$NADH \rightleftharpoons NAD^+ + H^+ + 2e^-$	–320 mV
Ubiquinona reduzida $\rightleftharpoons$ Ubiquinona oxidada $+ 2H^+ + 2e^-$	+30 mV
Citocromo *c* reduzido $\rightleftharpoons$ Citocromo *c* oxidado $+ e^-$	+230 mV
$H_2O \rightleftharpoons ½O_2 + 2H^+ + 2e^-$	+820 mV

CÁLCULO DE $\Delta G°$ A PARTIR DE POTENCIAIS REDOX

$$\Delta E'_0 = E'_0(\text{aceptor}) - E'_0(\text{doador})$$
$$\Delta E'_0 = +30 - (-320) = +350$$

$\Delta G° = -n(0{,}023)\,\Delta E'_0$, onde n é o número de elétrons transferidos por uma variação de potencial redox de $\Delta E'_0$ milivolts (mV)

Exemplo: A transferência de um elétron da NADH para a ubiquinona tem uma $\Delta G°$ favorável de –8,0 kcal/mol, calculado como segue:

$$\Delta G° = -n(0{,}023)\,\Delta E'_0 = -1(0{,}023)(350) = -8{,}0 \text{ kcal/mol}$$

O mesmo cálculo revela que a transferência de um elétron da ubiquinona para o oxigênio tem uma $\Delta G°$ ainda mais favorável de –18,2 kcal/mol. O valor de $\Delta G°$ para a transferência de um elétron da NADH para o oxigênio é a soma desses dois valores, –26,2 kcal/mol.

EFEITO DAS ALTERAÇÕES DE CONCENTRAÇÃO

Como explicado no Capítulo 3 (ver p. 92), a real variação de energia livre para a reação, ΔG, depende da concentração dos reagentes e será geralmente diferente da variação de energia livre padrão, $\Delta G°$. Os potenciais redox padrão são para uma mistura 1:1 do par redox. Por exemplo, o potencial redox padrão de –320 mV é para uma mistura 1:1 de NADH e NAD^+. Contudo, quando há excesso de NADH sobre NAD^+, a transferência de elétrons da NADH para um aceptor de elétrons se torna mais favorável. Isso se reflete por um potencial redox mais negativo e uma ΔG mais negativa para a transferência de elétrons.

Cauda hidrocarbonada hidrofóbica

Ubiquinona oxidada

Ubiquinona reduzida

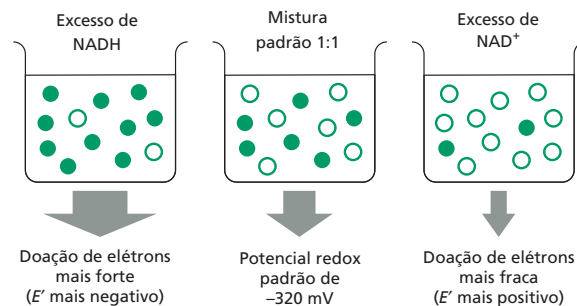
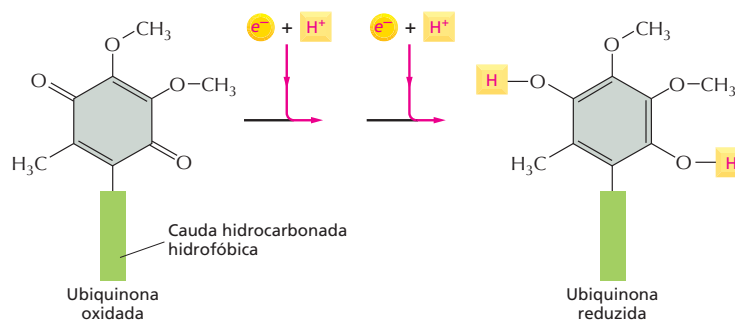



Figura 14-19 Quinonas transportam elétrons dentro da bicamada lipídica. A quinona na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é denominada ubiquinona. Ela capta um H^+ do ambiente aquoso para cada elétron que aceita e pode carregar dois elétrons como parte de um átomo de hidrogênio *(amarelo)*. Quando a ubiquinona reduzida doa os seus elétrons para o próximo carreador da cadeia, esses prótons são liberados. A longa cauda hidrofóbica confina a ubiquinona na membrana e consiste em 6 a 10 unidades isoprenoides de cinco carbonos, sendo esse número dependente do organismo.

à bicamada lipídica; na cadeia respiratória da mitocôndria, a quinona é denominada de *ubiquinona*. As quinonas são os únicos carreadores de elétrons, da cadeia de transporte de elétrons, que podem funcionar sem estarem ligados a uma proteína.

A ubiquinona capta elétrons do complexo NADH-desidrogenase e entrega-os ao complexo citocromo b-c_1 (ver Figura 14-9). A ubiquinona pode captar ou doar tanto um como dois elétrons e atrai um H^+ das redondezas para cada elétron que carrega (**Figura 14-19**). O seu potencial redox de +30 mV coloca a ubiquinona a cerca de um quarto abaixo do caminho da cadeia a partir da NADH em termos de perda energética (**Figura 14-20**). A ubiquinona também pode receber elétrons diretamente da $FADH_2$ gerada pelo ciclo do ácido cítrico ou pela oxidação de ácidos graxos. Como esses elétrons evitam a NADH-hidrogenase – a qual é uma das bombas de prótons na cadeia de transporte de elétrons –, eles promovem menos bombeamento de prótons do que os dois elétrons transportados a partir da NADH.

Os demais carreadores de elétrons da cadeia transportadora são pequenas moléculas ou grupos que possuem metais que estão firmemente ligados a proteínas. Por exemplo, para transferir da NADH para a ubiquinona, dentro do complexo NADH-desidrogenase, os elétrons são passados entre um grupo flavina (ver Figura 13-12 para estrutura) ligado ao complexo proteico e um conjunto de **centros ferro-enxofre** de potenciais redox cada vez maiores. O último centro ferro-enxofre da desidrogenase doa seus elétrons para a ubiquinona.

Os centros ferro-enxofre possuem relativas baixas afinidades por elétrons e, portanto, são mais eminentes na parte inicial da cadeia de transporte de elétrons. Posteriormente, na rota entre a ubiquinona e o O_2, átomos de ferro em

Figura 14-20 Os potenciais redox aumentam ao longo da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. O grande aumento no potencial redox ocorre através de cada um dos três complexos enzimáticos respiratórios, como necessário para cada um deles bombear prótons. Para converter os valores de energia livre em kJ/mol, recorde que 1 quilocaloria é igual a cerca de 4,2 quilojaules.

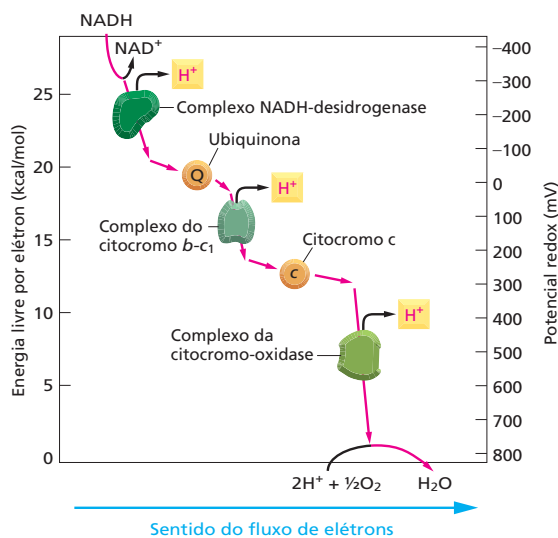
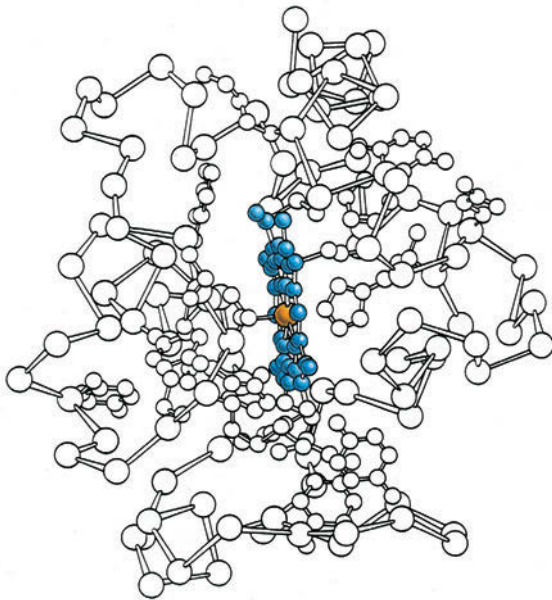



Figura 14-21 O citocromo *c* é um carreador de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. Essa pequena proteína possui pouco mais de 100 aminoácidos e está frouxamente aderida a face externa da membrana interna, por interações iônicas (ver Figura 14-9). O átomo de ferro (*laranja*) na ligação heme (*azul*) pode transportar um único elétron. A estrutura do grupo heme da hemoglobina, a qual se liga reversivelmente mais ao O_2 do que a um elétron, foi apresentada na Figura 4-33.

grupos heme que estão firmemente ligados a proteínas do citocromo são em geral utilizados como carreadores de elétrons, como nos complexos citocromo b-c_1 e citocromo-oxidase. Os **citocromos** constituem uma família de proteínas coloridas (de onde deriva seus nomes, do grego *chroma, "cor");* cada um contém um ou mais grupos heme cujos átomos de ferro mudam do estado férrico (Fe^{3+}) para ferroso (Fe^{2+}) sempre que aceitam um elétron. Como se esperaria, os diversos citocromos aumentam em potenciais redox à medida que se progride em direção ao oxigênio na cadeia transportadora de elétrons. A estrutura do *citocromo c,* uma pequena proteína que carrega elétrons entre o complexo citocromo b-c_1 e o complexo citocromo-oxidase, está apresentada na **Figura 14-21**: seu potencial redox é +230 mV.

Bem ao final da cadeia respiratória, imediatamente antes do oxigênio, os carreadores de elétrons são aqueles do complexo citocromo-oxidase. Os carreadores aqui são tanto átomos de ferro em grupos heme quanto átomos de cobre firmemente ligados ao complexo de uma forma específica que confere a eles um alto potencial redox.

QUESTÃO 14-6

Em muitas etapas da cadeia transportadora de elétrons, os íons de Fe são utilizados como parte de grupos heme ou FeS para ligar os elétrons em trânsito. Por que esses grupos funcionais que conduzem a química das transferências de elétrons precisam estar ligados a proteínas? Forneça várias razões diferentes para explicar por que isso é necessário.

A citocromo-oxidase catalisa a redução do oxigênio molecular

A **citocromo-oxidase** é um complexo proteico que recebe elétrons do citocromo *c,* oxidando-o (de onde deriva o seu nome de citocromo-oxidase), e doa esses elétrons para o oxigênio. Resumidamente, quatro elétrons do citocromo *c* e quatro prótons do ambiente aquoso são adicionados a cada molécula de O_2 na reação $4e^- + 4H^+ + O_2 \rightarrow 2H_2O$. Além dos prótons que acoplam com o O_2, quatro outros prótons são bombeados pela membrana durante a transferência de elétrons, construindo o gradiente eletroquímico de prótons.

Para que o bombeamento de prótons possa ocorrer, ele deve estar acoplado, de alguma forma, a reações energeticamente favoráveis. No caso da citocromo-oxidase, a energia vem da transferência de uma série de quatro elétrons para uma molécula de O_2 que está ligada firmemente a proteína; essa transferência de elétrons leva a mudanças alostéricas na conformação das proteínas que movem os prótons para fora da matriz mitocondrial. No seu sítio ativo, a citocromo-oxidase contém um complexo constituído por um átomo de ferro em um grupo heme justaposto a um átomo de cobre firmemente ligado

(Figura 14-22). É aqui que praticamente todo o oxigênio que respiramos é consumido, servindo como repositório para os elétrons que a NADH doou no início da cadeia transportadora de elétrons.

O oxigênio é útil como um escoadouro de elétrons em virtude da sua alta afinidade por elétrons. Contudo, uma vez que o O_2 tenha obtido um elétron, ele forma o radical superóxido O_2^-; esse radical é perigosamente reativo e irá avidamente captar outros três elétrons em qualquer lugar que possa encontrar – uma tendência que pode causar danos sérios ao DNA, às proteínas e às membranas lipídicas que se encontrarem por perto. Uma das funções da citocromo-oxidase é prender firmemente a molécula de oxigênio até que os quatro elétrons necessários para convertê-lo em duas moléculas de H_2O estejam disponíveis, prevenindo, assim, um ataque aleatório às macromoléculas celulares por radicais superóxido – danos que se supõe serem a causa maior do envelhecimento humano.

A evolução da citocromo-oxidase foi, portanto, crucial para a formação das células que são capazes de utilizar o O_2 como um aceptor de elétrons. Estima-se que a reação da citocromo-oxidase seja responsável por 90% do consumo total de oxigênio na maioria das células. Esse complexo proteico é, portanto, crucial para a vida aeróbia. Os venenos cianeto e azida são extremamente tóxicos porque se ligam firmemente aos complexos celulares da citocromo-oxidase, parando o transporte de elétrons e consequentemente reduzindo muito a produção de ATP.

O mecanismo de bombeamento de H^+ pode ser estudado em detalhe atômico

O mecanismo detalhado pelo qual o transporte de elétrons é acoplado ao bombeamento de H^+ é diferente em cada um dos três complexos enzimáticos respiratórios. Por exemplo, a ubiquinona possui um papel central no bombeamento através do complexo citocromo b-c_1, conforme a quinona capta um H^+ do meio aquoso, junto com cada elétron que ela carrega, vai liberar esse H^+ quando soltar o elétron (ver Figura 14-19). Como a ubiquinona é livremente móvel na bicamada

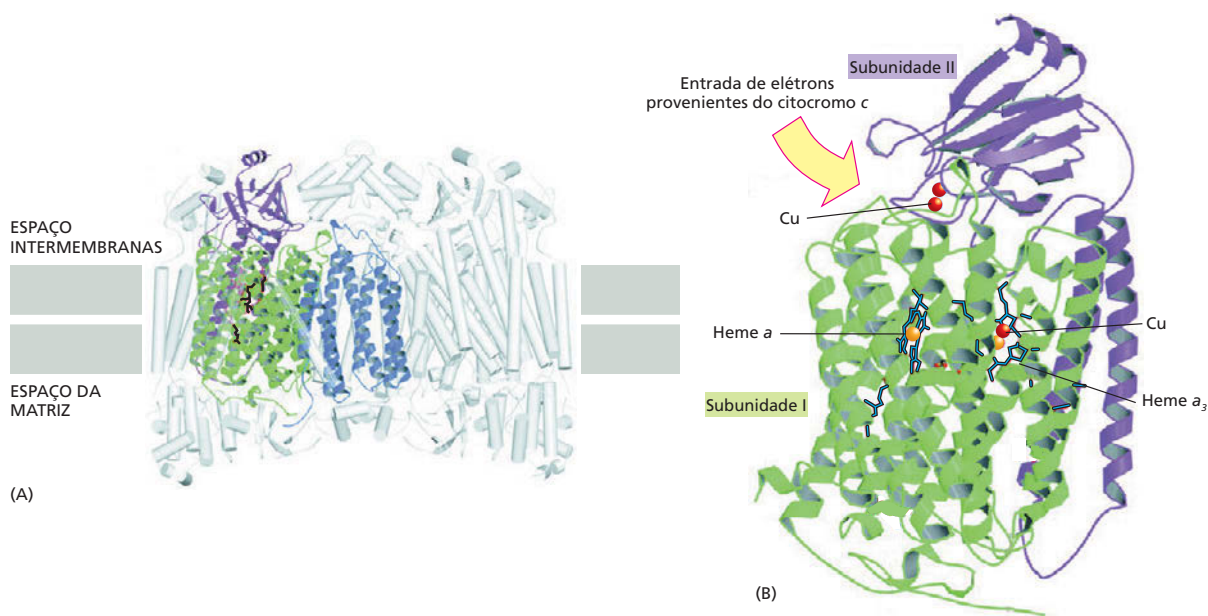



Figura 14-22 **A citocromo-oxidase é uma máquina proteica bastante sintonizada.** A proteína é um dímero formado por um monômero com 13 subunidades proteicas diferentes. As três subunidades coloridas que formam o cerne funcional do complexo são codificadas pelo genoma mitocondrial. Enquanto os elétrons passam por essa proteína a caminho de sua ligação à molécula de O_2, causam o bombeamento de prótons através da membrana pela proteína. (A) A proteína completa é mostrada, posicionada na membrana mitocondrial interna. (B) Os carreadores de elétrons estão localizados nas subunidades I e II, como indicado.

Figura 14-23 O bombeamento de H^+ pode ser causado por uma mudança conformacional na bomba proteica, conduzida por uma reação energeticamente favorável. Esse mecanismo para o bombeamento de H^+ por uma proteína transmembrana se baseia nos mecanismos que, acredita-se, são utilizados pela NADH-desidrogenase, citocromo-oxidase e por muitas outras bombas de prótons. A proteína é dirigida por um ciclo de três conformações: A, B e C. Como indicado pelo espaçamento vertical, essas conformações proteicas possuem diferentes energias. Na conformação A e B, a proteína possui alta afinidade por H^+, determinando a captação de um H^+ no lado interno da membrana. Na conformação C, a proteína possui baixa afinidade pelo H^+, determinando a liberação de um H^+ no lado de fora da membrana. A transição da conformação B para a conformação C, que libera o próton, é energeticamente desfavorável e só ocorre porque é promovida por ser alostericamente acoplada a uma reação favorável de energia que ocorre em outra porção da proteína *(seta azul)*. Para a citocromo-oxidase e a NADH-desidrogenase, essa reação transporta elétron. As outras duas mudanças conformacionais, A → B e C → A, levam a estados de baixa energia e ocorrem espontaneamente. Como o ciclo completo A → B → C → A libera energia livre, o H^+ é bombeado do lado interno (o espaço da matriz em mitocôndrias) para fora (o espaço intermembranas). Para outras bombas de prótons, como a bomba de Ca^{2+} nas células musculares, a energia necessária para a mudança conformacional B → C é fornecida pela hidrólise do ATP (ver Figura 12-15). Para a bacteriorrodopsina, essa energia provém da luz solar (ver Figura 11-28).

lipídica, ela pode receber elétrons próximo à face interna da membrana e doá-los para o complexo citocromo b-c_1 próximo à face externa. Desse modo, a ubiquinona transfere um H^+ através da bicamada para todo elétron que transportar. No entanto, dois prótons são bombeados por elétron no complexo do citocromo b-c_1, e há boas evidências de um assim chamado *ciclo Q,* no qual a ubiquinona é reciclada pelo complexo de um modo intrincado, mas ordenado, que torna possível essa transferência de dois-por-um.

Mudanças alostéricas nas conformações das proteínas podem também bombear H^+. Tanto no complexo NADH-desidrogenase quanto no complexo citocromo-oxidase, o transporte de elétrons promove mudanças alostéricas sequenciais na conformação das proteínas, levando ao bombeamento de H^+ através da membrana mitocondrial interna. Um mecanismo geral para esse tipo de bombeamento de H^+ é apresentado na **Figura 14-23**.

A respiração é surpreendentemente eficiente

As variações de energia livre para a queima de gorduras e carboidratos diretamente em CO_2 e H_2O podem ser comparadas à quantidade total de energia gerada e estocada nas ligações de fosfato do ATP durante as correspondentes oxidações biológicas. Quando isso é feito, vê-se que a eficiência de conversão de cada energia de oxidação em energia de ligação do ATP é frequentemente maior do que 40%. Isso é consideravelmente melhor do que a eficiência da maioria dos aparelhos conversores de energia não biológicos. Se as células trabalhassem somente com a eficiência de um motor elétrico ou movido a gasolina (10-20%), um organismo teria de alimentar-se vorazmente de forma a se manter. Além disso, uma vez que a energia não utilizada é liberada na forma de calor, grandes organismos (incluindo nós mesmos) necessitariam de mecanismos mais eficientes do que os presentes para liberar calor para o ambiente.

Os estudantes eventualmente se preocupam em saber por que as interconversões químicas nas células seguem vias tão complexas. A oxidação de açúcares em CO_2 e H_2O poderia certamente estar acoplada mais diretamente, eliminando

QUESTÃO 14-7

Dois diferentes carreadores difusíveis de elétrons, ubiquinona e citocromo *c*, transportam elétrons entre os três complexos proteicos da cadeia transportadora de elétrons. Poderiam ser utilizados, em princípio, os mesmos carreadores difusíveis em ambas as etapas? Explique a sua resposta.

o ciclo do ácido cítrico e muitas das etapas da cadeia respiratória. Isso tornaria a respiração mais fácil para os estudantes aprenderem, mas seria um desastre para as células. A oxidação produz enormes quantidades de energia livre, a qual só pode ser eficientemente utilizada em pequenas doses. As vias oxidativas biológicas envolvem muitos intermediários, cada um diferindo do seu predecessor em mínimos detalhes. A energia liberada é, portanto, parcelada em pequenos pacotes para que possa ser eficientemente convertida em ligações de alta energia em moléculas úteis, como ATP e NADH, por meio de reações acopladas (ver Figura 13-1).

Tendo visto como o acoplamento quimiosmótico é utilizado para gerar ATP nas mitocôndrias, veremos agora como ele aproveita a energia luminosa para a geração de ATP nos cloroplastos.

OS CLOROPLASTOS E A FOTOSSÍNTESE

Praticamente todos os materiais orgânicos necessários pelas células vivas atuais são produzidos pela **fotossíntese** – séries de reações promovidas pela luz que criam moléculas orgânicas a partir do dióxido de carbono atmosférico (CO_2). Plantas, algas e as mais avançadas das bactérias fotossintetizantes, como as cianobactérias, utilizam elétrons da água e a energia da luz solar para converter CO_2 atmosférico em compostos orgânicos. No curso de quebra da água, elas liberam na atmosfera vastas quantidades de gás oxigênio. Esse oxigênio é, por seu turno, requerido para a respiração celular – não somente em animais, mas também em plantas e muitas bactérias. Desse modo, a atividade de bactérias fotossintetizantes primitivas, as quais encheram a atmosfera com oxigênio, permitiram a evolução de formas de vida que usam metabolismo aeróbio para produzir seu ATP (**Figura 14-24**).

Nas plantas, a fotossíntese é conduzida em uma organela intracelular especializada – o **cloroplasto**, que possui pigmentos, como o pigmento verde clorofila, que capturam a luz. Todas as partes verdes de um vegetal possuem cloroplastos; mas para a maioria das plantas, as folhas é que são o principal local da fotossíntese. Os cloroplastos realizam a fotossíntese durante as horas diurnas. O processo produz ATP e NADPH, as quais são utilizadas para converter CO_2 em açúcares dentro dos cloroplastos. Assim, começaremos a discussão da fotossíntese pela descrição da estrutura dessa organela especializada.

(A)

(B)

(C)

Figura 14-24 Os microrganismos que realizam fotossíntese produzindo oxigênio mudaram a atmosfera da Terra. (A) Estromatólitos vivos de uma lagoa no oeste da Austrália. Essas estruturas são produzidas em condições ambientais específicas por grandes colônias de cianobactérias fotossintetizantes produtoras de oxigênio, as quais depositam camadas sucessivas de material. (B) Secção transversal de um estromatólito atual mostrando sua estrutura em camadas. (C) Secção transversal de um estromatólito fóssil em uma rocha de 3,5 bilhões de anos. Note a estrutura em camadas semelhante àquela em (B). Acredita-se que estromatólitos fósseis tenham sido formados por bactérias muito semelhantes às cianobactérias atuais. As atividades de bactérias como estas, as quais liberam gás O_2 como subproduto da fotossíntese, teriam vagarosamente mudado a atmosfera da Terra. (A, cortesia de Sally Birch, com autorização da Oxford Scientific Films; B e C, cortesia de S.M. Awramik, University of California/Biological Photo Service.)

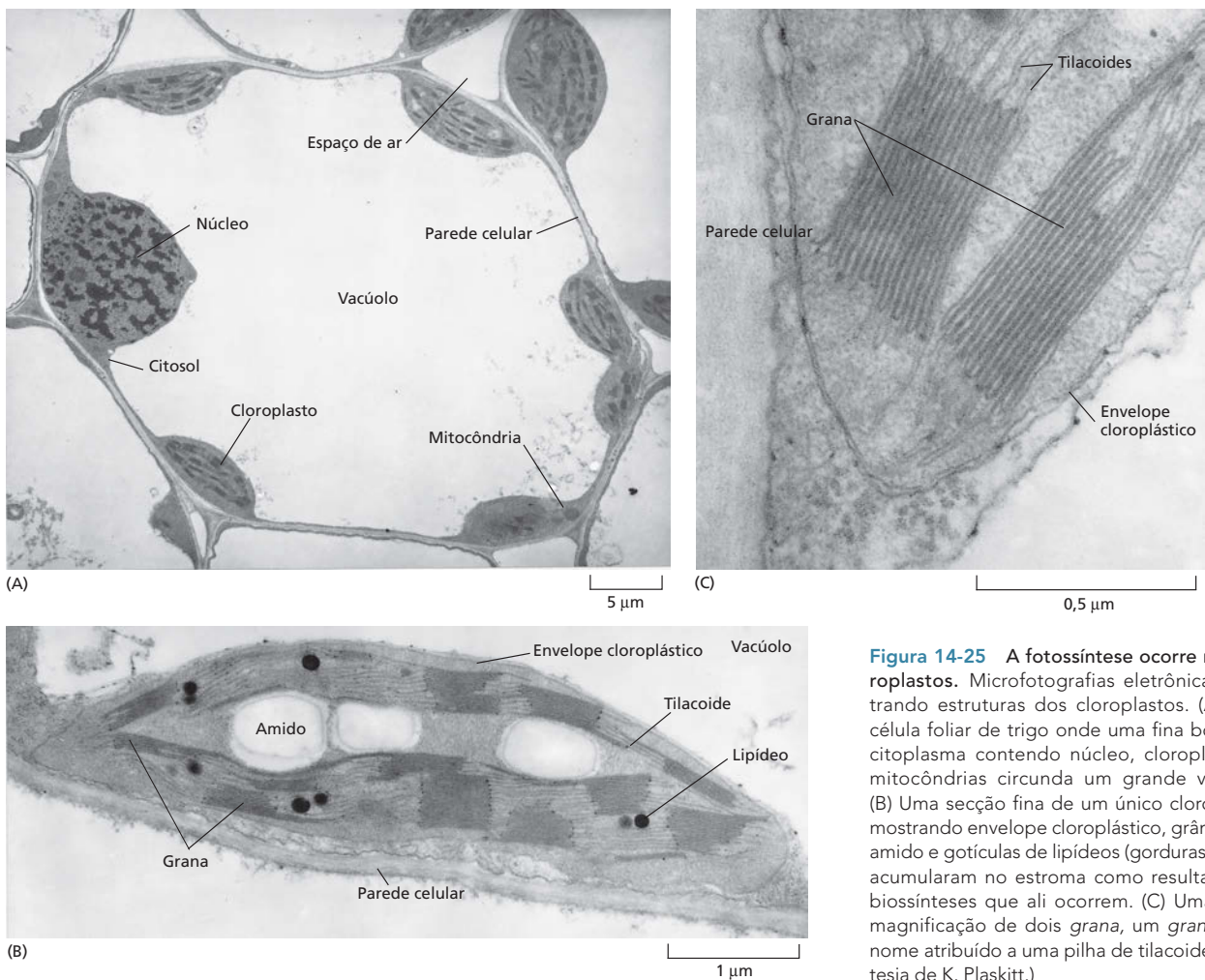



Figura 14-25 A fotossíntese ocorre nos cloroplastos. Microfotografias eletrônicas mostrando estruturas dos cloroplastos. (A) Uma célula foliar de trigo onde uma fina borda de citoplasma contendo núcleo, cloroplastos e mitocôndrias circunda um grande vacúolo. (B) Uma secção fina de um único cloroplasto, mostrando envelope cloroplástico, grânulos de amido e gotículas de lipídeos (gorduras) que se acumularam no estroma como resultado das biossínteses que ali ocorrem. (C) Uma maior magnificação de dois *grana*, um *granum* é o nome atribuído a uma pilha de tilacoides. (Cortesia de K. Plaskitt.)

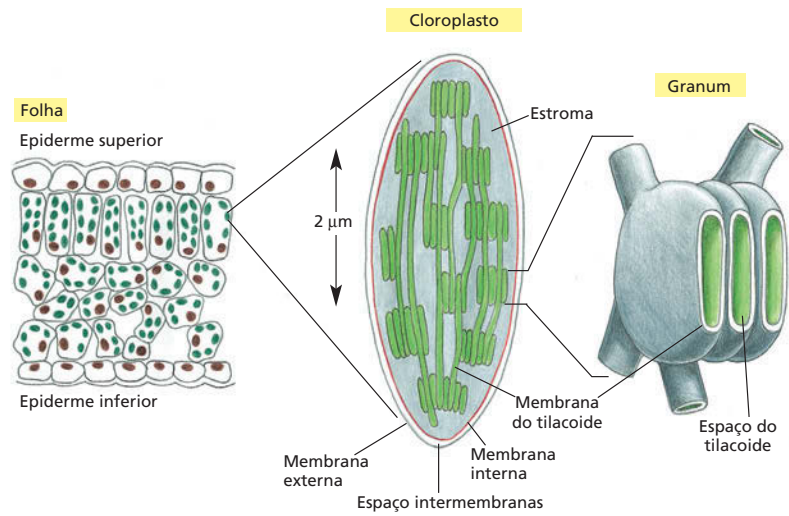
Os cloroplastos se assemelham às mitocôndrias, mas possuem um compartimento extra

Os cloroplastos conduzem as suas interconversões energéticas por meio de gradientes de prótons de forma muito parecida aos mecanismos empregados pelas mitocôndrias. Embora sejam maiores (**Figura 14-25A**), eles estão organizados pelos mesmos princípios das mitocôndrias. Eles possuem uma membrana externa altamente permeável, uma membrana interna muito menos permeável, onde as proteínas de transporte estão embebidas. Juntas, essas membranas – e o estreito espaço intermembranas entre elas – formam o envelope do cloroplasto (Figura 14-25B). A membrana interna circunda um grande espaço denominado **estroma**, o qual é análogo à matriz mitocondrial e contém muitas enzimas metabólicas.

Existe, contudo, uma importante diferença entre a organização da mitocôndria e a do cloroplasto. A membrana interna do cloroplasto não possui cadeias de transporte de elétrons. Os sistemas captadores de luz, as cadeias transportadoras de elétrons e as ATP-sintases estão todos contidos na *membrana do tilacoide,* uma terceira membrana que forma um conjunto de sacos chatos em forma de discos, os *tilacoides* (Figura 14-25C). Esses estão arranjados em pilhas, e o espaço dentro de cada tilacoide, acredita-se, está conectado com aqueles de outros tilacoides, definindo um terceiro compartimento contínuo que está separado do estroma pela membrana tilacoide (**Figura 14-26**).

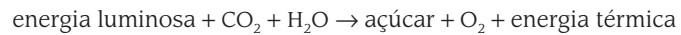
QUESTÃO 14-8

Os cloroplastos possuem um terceiro compartimento interno, o espaço do tilacoide, delimitado pela membrana do tilacoide. Essa membrana contém os fotossistemas, os centros de reação, a cadeia transportadora de elétrons e a ATP-sintase. Em contraste, as mitocôndrias utilizam as suas membranas internas para o transporte de elétrons e a síntese de ATP. Em ambas as organelas, os prótons são bombeados para fora do maior compartimento interno (a matriz nas mitocôndrias e o estroma nos cloroplastos). O espaço do tilacoide é completamente isolado do resto da célula. Por que esse arranjo permite aos cloroplastos gradientes maiores de H^+ do que ocorre em mitocôndrias?

Figura 14-26 Um cloroplasto contém um terceiro compartimento interno. Essa organela fotossintetizante contém três membranas distintas (a membrana externa, a membrana interna e a membrana do tilacoide) que definem três compartimentos internos separados (o espaço intermembranas, o estroma e o espaço do tilacoide). A membrana do tilacoide contém todos os sistemas geradores de energia do cloroplasto, incluindo as clorofilas. Em fotografias de microscopia eletrônica, essa membrana parece estar quebrada em unidades separadas que se fecham em vesículas chatas individuais (ver Figura 14-25C), porém essas estão provavelmente unidas em uma membrana simples, altamente dobrada em cada cloroplasto. Como indicado, cada tilacoide individual está interconectado e tende a empilhar-se, formando *grana*.

As semelhanças estruturais entre mitocôndrias e cloroplastos estão ilustradas na **Figura 14-27**.

Os cloroplastos capturam a energia da luz solar e a utilizam para fixar carbono

Como visto no Capítulo 3, todas as equações que resumem os resultados líquidos da fotossíntese podem ser descritas da seguinte forma:

$$\text{energia luminosa} + CO_2 + H_2O \rightarrow \text{açúcar} + O_2 + \text{energia térmica}$$

Embora a equação seja simples, as reações que permitem que o processo ocorra são elaboradas. De forma geral, entretanto, as muitas reações que compõem a fotossíntese dos vegetais ocorrem em dois estágios:

1. No primeiro estágio, o qual é dependente da luz, a energia da luz solar é capturada e transientemente armazenada em ligações de alta energia da ATP e da molécula carreadora ativada NADPH. Essa produção de energia pelas *reações fotossintéticas de transferência de elétrons*, também denominadas "reações luminosas", ocorrem inteiramente dentro da membrana do tilacoide do cloroplasto. Nessa série de reações, a energia proveniente da luz solar energiza um elétron do pigmento orgânico verde **clorofila**, capacitando o elétron a mover-se ao longo de uma cadeia transportadora de elétrons da membrana do tilacoide de uma forma muito semelhante ao movimento de elétrons através da cadeia respiratória das mitocôndrias. O

Figura 14-27 Comparados às mitocôndrias, os cloroplastos são maiores e têm um compartimento extra. Um cloroplasto contém, além das membranas internas e externas, uma membrana do tilacoide delimitando o espaço do tilacoide; essa contém os sistemas captadores de luz, as cadeias transportadoras de elétrons e a ATP-sintase. Diferentemente da membrana interna cloroplástica, a membrana interna mitocondrial é dobrada em cristas, de forma a aumentar a sua área de superfície. Como será discutido mais tarde no capítulo, ambas as organelas possuem os seus próprios genomas e sistema genético. Contudo, o estroma, assim como a matriz mitocondrial, também possui um grupo especial de ribossomos, RNA e DNA (*vermelho*).

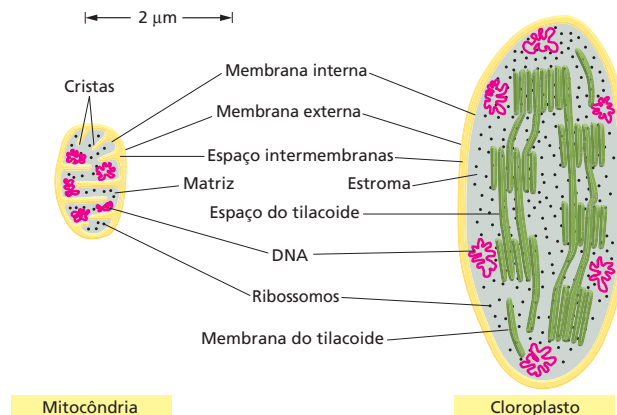
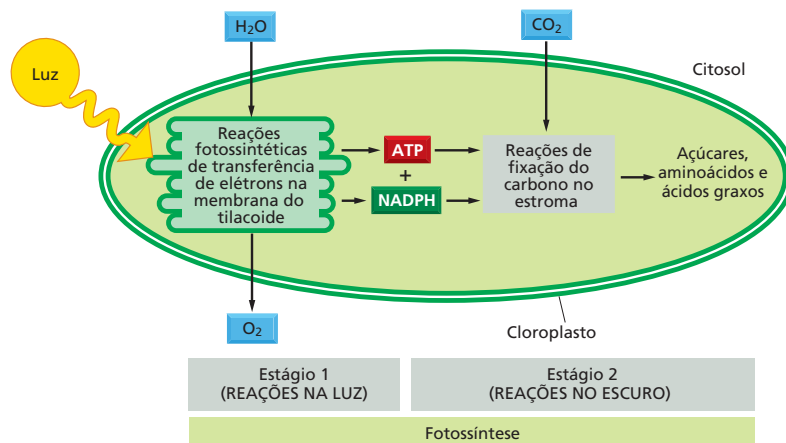



Figura 14-28 **As duas fases da fotossíntese dependem do cloroplasto.** A água é oxidada e o oxigênio é liberado nas reações fotossintéticas de transferência de elétrons que produz ATP e NADPH (fase 1), ao passo que o dióxido de carbono é assimilado (fixado) para produzir açúcares e uma variedade de outras moléculas orgânicas nas reações de fixação do carbono (fase 2). A fase 2 inicia no estroma do cloroplasto (como apresentado) e continua no citosol.

elétron que a clorofila doa à cadeia transportadora de elétrons é restituído pelo elétron extraído da água. Esse arraste de elétrons quebra uma molécula de água (H_2O), produzindo O_2 como subproduto. Durante o processo de transporte de elétrons, o H^+ é bombeado através da membrana do tilacoide, e o gradiente eletroquímico de prótons resultante promove a síntese de ATP no estroma. Como fase final nessa série de reações, os elétrons de alta energia são movidos (juntamente com H^+) para o $NADP^+$, convertendo-o em NADPH (**Figura 14-28**).

2. No segundo estágio da fotossíntese, independente de luz, o ATP e o NADPH produzidos pelas reações fotossintéticas de transferência de elétrons servem como fonte de energia e força redutora, respectivamente, para promover a conversão de CO_2 em carboidratos (ver Figura 14-28). Essas reações de fixação do carbono, também denominadas "reações no escuro", iniciam no estroma do cloroplasto e continuam no citosol da célula. Eles produzem sacarose e muitas outras moléculas orgânicas nas folhas dos vegetais. A sacarose é exportada para outros tecidos como fonte de moléculas orgânicas e energia para o crescimento.

Portanto, a formação de ATP, NADPH e O_2 (que requer diretamente energia luminosa) e a conversão de CO_2 em carboidratos (que requer indiretamente energia luminosa) são processos distintos, embora mecanismos elaborados de retroalimentação interconectem as duas. Muitas das enzimas cloroplásticas necessárias para a fixação do carbono, por exemplo, são inativadas no escuro e reativadas pelo processo de transporte de elétrons estimulado pela luz.

A luz do sol é absorvida pelas moléculas de clorofila

A luz visível é uma forma de radiação eletromagnética composta de muitos comprimentos de onda diferentes, variando do violeta (comprimento de onda de 400 nm) ao vermelho profundo (700 nm). Quando consideramos eventos em nível de uma única molécula – como a absorção de luz por uma molécula de clorofila –, temos de descrever a luz como sendo composta por pacotes discretos de energia denominados *fótons.* A luz de diferentes cores é distinguida por fótons com diferentes energias, com os maiores comprimentos de onda correspondendo as menores energias. Portanto, fótons da luz vermelha possuem energia mais baixa do que fótons da luz verde.

Quando a luz solar é absorvida por uma molécula do pigmento verde clorofila, os elétrons da molécula interagem com os fótons da luz e são excitados a um nível mais alto de energia. Os elétrons da extensa rede de ligações duplas e simples alternadas da molécula de clorofila (**Figura 14-29**) absorvem a luz vermelha mais fortemente, esse é o motivo pelo qual a clorofila parece verde.

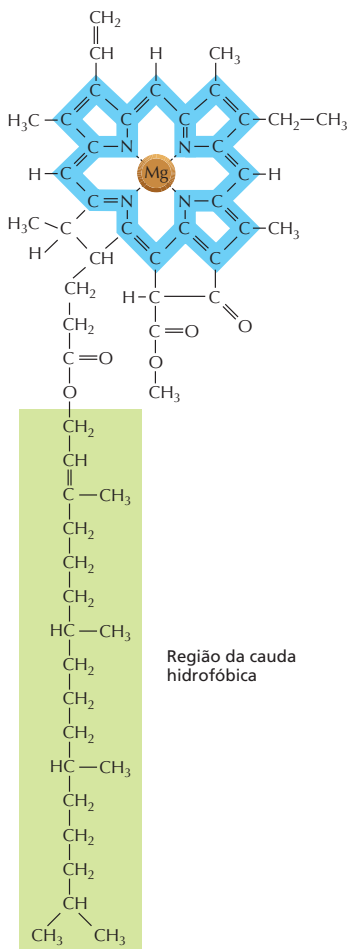



Figura 14-29 A clorofila é um pigmento verde que absorve energia de fótons de luz. Um átomo de magnésio *(laranja)* é mantido no centro de uma anel porfirínico, o qual é estruturalmente semelhante ao anel porfirínico que liga o ferro no grupo heme. A luz é absorvida por elétrons dentro da rede de ligações apresentada em *azul*, e a longa cauda hidrofóbica ajuda a sustentar a clorofila na membrana do tilacoide.

As moléculas excitadas de clorofila direcionam a energia a um centro de reação

Uma molécula isolada de clorofila é incapaz de converter a luz que absorve em uma forma de energia útil para os sistemas vivos. Ela só pode fazê-lo quando está associada a proteínas adequadas e embebida em uma membrana. Nas membranas dos tilacoides vegetais e em membranas de bactérias fotossintetizantes, as clorofilas capazes de absorver a luz estão sustentadas em grandes complexos multiproteicos denominados **fotossistemas**. Cada fotossistema possui um **complexo antena** que captura a energia luminosa e um **centro de reação** que possibilita que essa energia luminosa seja convertida em energia química. A porção da antena de um fotossistema consiste em centenas de moléculas de clorofilas que capturam a energia luminosa na forma de elétrons excitados (de alta energia). Essas clorofilas estão arranjadas de tal forma que a energia de um elétron excitado pode ser passada de uma molécula de clorofila à outra, até ser finalmente direcionada a duas moléculas de clorofila denominadas *par especial* (**Figura 14-30**). Essas duas clorofilas estão localizadas no centro de reação, um complexo proteico adjacente ao complexo antena na membrana. Lá a energia é aprisionada e utilizada para energizar um elétron de um *par especial* de moléculas de clorofila.

O centro de reação é um complexo transmembrânico de proteínas e pigmentos orgânicos que se posiciona no coração da fotossíntese. Acredita-se que evoluiu há mais de 3 bilhões de anos em bactérias fotossintetizantes primitivas. Estudos estruturais e funcionais detalhados têm revelado como ele funciona em nível atômico de detalhe (**Animação 14.6**). O centro de reação age como uma armadilha irreversível para um elétron excitado, porque esses pares especiais de clorofilas estão posicionados de forma a passar elétrons de alta energia a uma molécula vizinha posicionada de forma precisa no mesmo complexo proteico. Pelo movimento rápido do elétron energizado para longe das clorofilas, um processo denominado *separação de carga*, o centro de reação transfere esse elétron de alta energia para um ambiente onde ele é muito mais estável.

Figura 14-30 Um fotossistema contém um centro de reação e uma antena. A antena coleta a energia de elétrons que foram excitados pela luz e direciona essa energia (a transferência de energia está indicada por setas *vermelhas* tracejadas) para um par especial de moléculas de clorofila no centro de reação. Esse produz um elétron de alta energia no par especial, que pode ser rapidamente transferido (a transferência de elétrons está indicada por setas *vermelhas* sólidas) para a cadeia transportadora de elétrons na membrana do tilacoide, via quinona (Q). Além da clorofila, a antena possui pigmentos acessórios adicionais (não apresentados) que auxiliam na captura da energia luminosa de diferentes comprimentos de onda. A proteína do centro de reação (*laranja*) adquire elétrons de baixa energia necessários para que o sistema retorne ao estado original não excitado (a transferência de elétrons está indicada por setas *vermelhas* pontilhadas, como poderá ser visto na Figura 14-31).

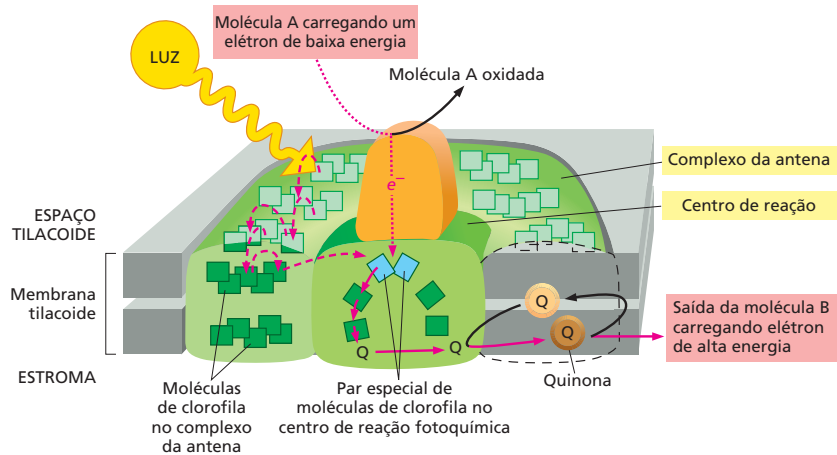
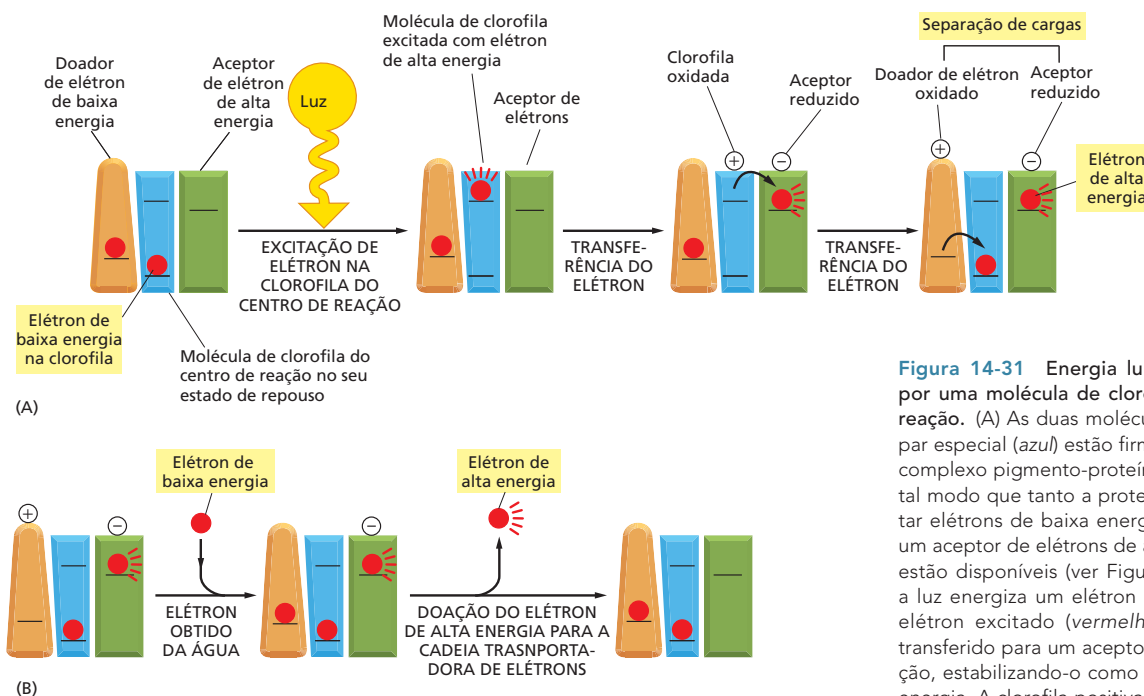



Figura 14-31 Energia luminosa é captada por uma molécula de clorofila do centro de reação. (A) As duas moléculas de clorofila no par especial (*azul*) estão firmemente presas no complexo pigmento-proteína, posicionado de tal modo que tanto a proteína que pode captar elétrons de baixa energia *(laranja)* quanto um aceptor de elétrons de alta energia *(verde)* estão disponíveis (ver Figura 14-30). Quando a luz energiza um elétron do par especial, o elétron excitado (*vermelho*) é rapidamente transferido para um aceptor no centro de reação, estabilizando-o como um elétron de alta energia. A clorofila positivamente carregada e oxidada rapidamente atrai um elétron de baixa energia do doador, retornando ao estado de repouso. Essas reações, as quais criam uma separação de cargas entre o doador de elétrons e o receptor, requerem menos de 10^{-6} segundo para se completarem. (B) Na fase final do processo, a qual segue as etapas em (A), o centro de reação inteiro é restaurado ao seu estado original, tanto pela extração de um novo elétron de baixa energia (a partir da água, nesse caso) quanto pela transferência de seu elétron de alta energia para a cadeia transportadora de elétrons. Assim, em toda a reação, elétrons de baixa energia obtidos da água são consumidos, e elétrons de alta energia são produzidos na membrana do tilacoide.

Quando a molécula de clorofila do centro de reação perde um elétron, ela se torna positivamente carregada. Ela então recupera rapidamente um elétron do doador de elétrons adjacente para retornar a um estado não excitado e não carregado (**Figura 14-31A**). Então, em reações lentas, esse doador de elétrons é regenerado a partir de um elétron removido da água. O elétron de alta energia que foi gerado pela clorofila excitada é então transferido para a cadeia transportadora de elétrons. Essa transferência deixa o centro de reação pronto para receber o próximo elétron excitado pela luz solar (Figura 14-31B).

A energia luminosa promove a síntese de ATP e de NADPH

Na mitocôndria, a cadeia transportadora de elétrons funciona exclusivamente para gerar ATP. Contudo, nos cloroplastos e em organismos fotossintéticos de vida livre, como as cianobactérias, a cadeia transportadora de elétrons possui um papel adicional: Ela também produz a molécula carreadora ativada NADPH (ver Figura 3-34). O NADPH é necessário, pois a fotossíntese é, basicamente, um processo biosintético. Para construir moléculas orgânicas a partir do CO_2, a célula necessita de uma grande quantidade de energia na forma de ATP e uma larga quantidade de poder redutor, na forma de NADPH. Para produzir este NADPH a partir de $NADP^+$, a célula utiliza a energia capturada da luz solar para converter elétrons de baixa energia da água em elétrons de alta energia do NADPH.

Para produzir tanto ATP quanto NADPH, as células vegetais e cianobactérias utilizam dois fótons de luz: o ATP é produzido após o primeiro fóton ser absorvido, e o NADPH após o segundo fóton. Esses fótons são absorvidos por dois fotossistemas que funcionam em série. Trabalhando juntos, fornecem a um elétron a energia suficientemente elevada para produzir o NADPH. Ao longo da via, um gradiente de prótons é gerado, permitindo a produção de ATP.

Em resumo, o processo funciona da seguinte forma: o primeiro fóton de luz é absorvido por um fotossistema (por razões históricas, ele é paradoxalmente denominado *fotossistema II)*. Como foi visto, esse fóton é utilizado para produzir um elétron de alta energia que é transferido para uma cadeia transpor-

tadora de elétrons (ver Figura 14-31). Enquanto viaja ao longo da cadeia transportadora, o elétron promove uma bomba de H^+ da membrana tilacoide e cria um gradiente de prótons da maneira previamente descrita para a fosforilação oxidativa. Uma ATP-sintase da membrana tilacoide utiliza, então, esse gradiente de prótons para promover a síntese de ATP na face estromática da membrana (**Figura 14-32**).

Entretanto, a cadeia transportadora de elétrons impele o elétron gerado pelo fotossistema II para o segundo fotossistema na via (denominado fotossistema I). Nesse fotossistema, o elétron preenche um "buraco" positivamente carregado do centro de reação que foi criado por um elétron que deixou o centro do fotossistema I, quando esse absorveu o segundo fóton de luz. Uma vez que o fotossistema I inicia em um nível de energia mais alto do que o fotossistema II, ele é capaz de potencializar os elétrons ao nível de energia mais alto, necessário para produzir o NADPH a partir do $NADP^+$ (ver Figura 14-32). Os potenciais redox dos componentes ao longo dessa cadeia transportadora de elétrons estão apresentados na **Figura 14-33**.

No processo completo descrito até aqui, foi visto que um elétron removido de uma molécula de clorofila do centro de reação do fotossistema II viaja todo o caminho através de uma cadeia transportadora de elétrons na membrana do tilacoide até acabar sendo doado ao NADPH. Esse elétron inicial deve ser reposto para que o sistema retorne a um estado não excitado. O elétron de reposição é proveniente de um doador de elétrons de baixa energia, o qual, nos vegetais e em muitas bactérias fotossintetizantes, é a água (ver Figura 14-31B). O centro de reação do fotossistema II inclui uma enzima de quebra da água que sustenta os átomos de oxigênio de duas moléculas de água presas a um aglomerado de átomos de manganês da proteína (**Figura 14-34**; ver também Figura 14-32). Essa enzima remove os elétrons da água um de cada vez para preencher os espaços criados pela luz nas moléculas de clorofila do centro de reação. Quando quatro elétrons são removidos de duas moléculas de água (o que requer quatro fótons de luz), o O_2 é liberado. É esse processo fundamental, o qual ocorre há bilhões de anos, que gerou todo o O_2 da atmosfera terrestre.

QUESTÃO 14-9

Tanto o NADPH quanto a molécula carreadora relacionada NADH, são fortes doadoras de elétrons. Por que as células vegetais desenvolveram a NADPH em detrimento da NADH para fornecer poder redutor para a fotossíntese?

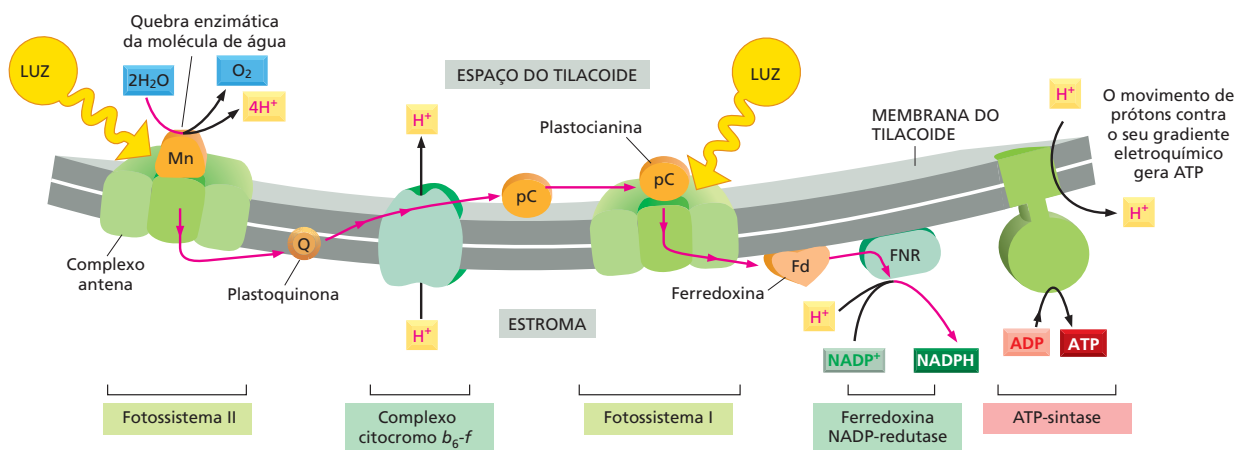



Figura 14-32 Durante a fotossíntese, os elétrons se movimentam por uma cadeia transportadora de elétrons na membrana do tilacoide. A energia luminosa é capturada pelo complexo antena, nos dois fotossistemas embebidos na membrana, e convergida para um par especial de moléculas de clorofila no centro de reação. Como mostrado na Figura 14-30, elétrons excitados de alta energia são produzidos no par especial, os quais são transferidos através de uma série de aceptores no interior do centro de reação, antes de serem transferidos para a cadeia transportadora de elétrons na membrana do cloroplasto. Os carreadores móveis na cadeia transportadora de elétrons do cloroplasto são a plastoquinona (Q, semelhante à ubiquinona da mitocôndria), a plastocianina (pC, uma pequena proteína contendo cobre) e a ferredoxina (Fd, uma pequena proteína contendo um centro ferro-enxofre). O complexo citocromo b_6-f se assemelha ao complexo citocromo b-c_1 das mitocôndrias e é o único sítio de bombeamento ativo de H^+ na cadeia transportadora de elétrons dos cloroplastos. A liberação de H^+ pela quebra da água no fotossistema II e a captação de H^+ durante a formação do NADPH, pela proteína ferredoxina NADP-redutase (FNR), a última proteína na cadeia transportadora de elétrons, também contribuem para a geração do gradiente eletroquímico de prótons. Como indicado, o gradiente de prótons dirige uma ATP-sintase localizada na mesma membrana para gerar ATP. Uma visão geral das reações fotossintéticas é apresentada na **Animação 14.7**.

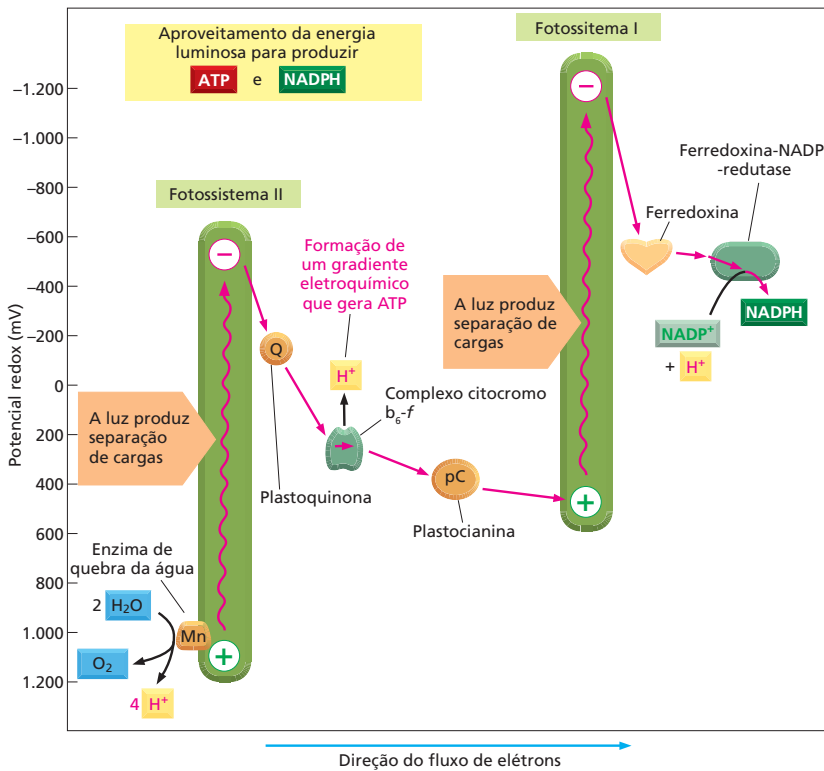



Figura 14-33 O acoplamento dos fotossistemas I e II impulsiona os elétrons para níveis de energia necessários para produzir o NADPH. O potencial redox para cada molécula está indicado pela sua posição em relação ao eixo vertical. O fotossistema II transfere elétrons de seu par especial de clorofila, através de uma cadeia transportadora de elétrons da membrana do tilacoide, levando-os ao fotossistema I. O fluxo líquido de elétrons através dos dois fotossistemas ligados em série parte da água para o $NADP^+$, produzindo NADPH, bem como ATP. O ATP é sintetizado por uma ATP-sintase (não representada) que aproveita o gradiente eletroquímico de prótons produzido pelo transporte de elétrons.

Os cloroplastos podem ajustar a sua produção de ATP

Além de realizar o processo fotossintético resumido até aqui, os cloroplastos também formam ATP sem produzir NADPH. Para produzir este ATP extra, os cloroplastos alteram o fotossistema I para um modo cíclico que produz ATP em vez de NADPH. Nesse processo, denominado **fotofosforilação cíclica**, os elétrons de alta energia produzidos pelo fotossistema I, ativado pela luz, são transferidos de volta para o complexo citocromo b_6-*f*, em detrimento de serem transferidos para o $NADP^+$. Do complexo citocromo b_6-*f*, os elétrons são levados de volta, com baixa energia, ao fotossistema I (Figura 14-35). O resultado líquido, à parte da conversão de alguma energia luminosa em calor, é que H^+ são bombeados através da membrana do tilacoide quando elétrons passam pelo complexo citocromo b_6-*f*. Esse ciclo aumenta o gradiente eletroquímico de prótons que conduz a síntese de ATP. As células ajustam a quantidade relativa de fotofosforilação cíclica (a qual envolve somente o fotossistema I) e a forma-padrão, não cíclica, da

Figura 14-34 As estruturas completas tridimensionais dos fotossistemas I e II são conhecidas. Esse diagrama apresenta a estrutura do fotossistema II, o qual é um complexo dimérico que possui mais de 20 proteínas e várias dúzias de clorofilas. (Adaptada de K. N. Ferreira *et al.*, *Science* 303:1831-1838. Com permissão da AAAS)

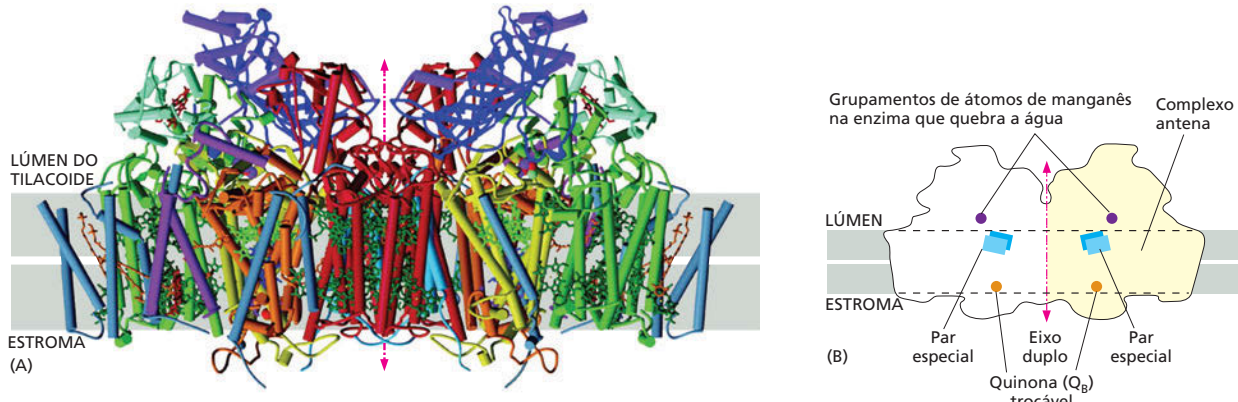
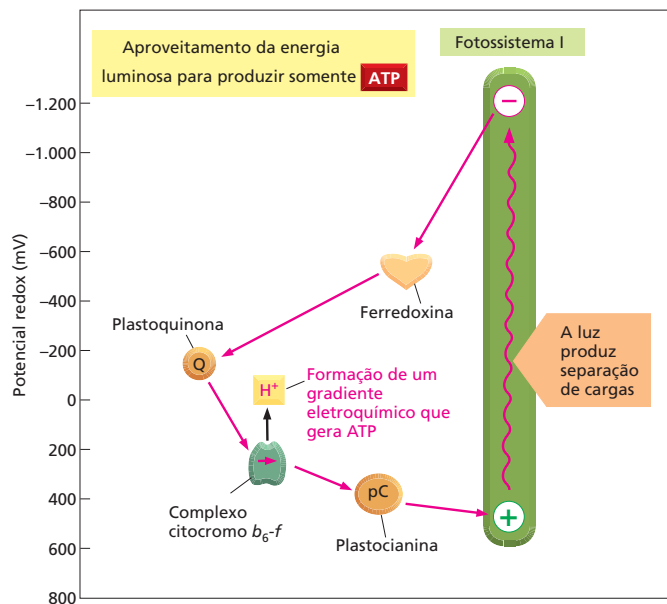



Figura 14-35 Cloroplastos podem produzir ATP pela fotofosforilação cíclica. Esta via permite a síntese de ATP sem a produção de NADPH nem O_2. Quando o NADPH se acumula, a célula tende a favor deste esquema cíclico.

fotofosforilação (a qual envolve tanto o fotossistema I quanto o II), dependendo da sua necessidade relativa de poder redutor (na forma de NADPH) e de ligações fosfato de alta energia (na forma de ATP).

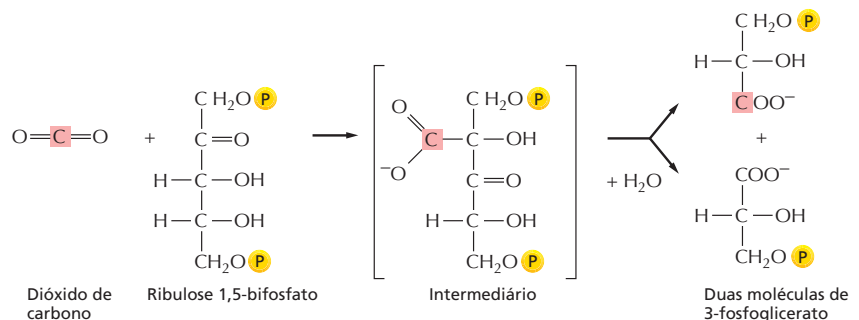
A fixação de carbono utiliza ATP e NADPH para converter CO_2 em açúcares

As reações luminosas da fotossíntese geram ATP e NADPH no estroma do cloroplasto. Contudo, a membrana interna do cloroplasto é impermeável a ambos os compostos, o que significa que eles não podem ser exportados diretamente para o citosol. Para fornecer poder redutor e energia para o resto da célula, o ATP e o NADPH são preferencialmente utilizados dentro do estroma do cloroplasto para produzir açúcares que podem então ser exportados. Esta produção de açúcar, a qual ocorre durante as reações de fase escura da fotossíntese, é denominada **fixação de carbono**.

A reação central da fixação fotossintética de carbono, na qual um átomo de carbono inorgânico (como CO_2) é convertido em carbono orgânico, está ilustrada na **Figura 14-36**. O CO_2 da atmosfera se combina com o açúcar de cinco carbonos *ribulose-1,5-bifosfato* e água para produzir duas moléculas do composto de três carbonos 3-fosfoglicerato. Essa reação de fixação de carbono, descoberta em 1948, é catalisada no estroma do cloroplasto por uma grande enzima denominada *ribulose-bifosfato-carboxilase* (também denominada *ribulose-bifosfato-carboxilase/oxigenase – Rubisco)*. Uma vez que essa enzima trabalha de forma extremamente lenta, quando comparada com a maioria das

O=C=O + [CH_2O P; C=O; H–C–OH; H–C–OH; CH_2O P] → [O; ^-O–C–C–OH (CH_2O P); C=O; H–C–OH; CH_2O P] + H_2O → [CH_2O P; H–C–OH; COO^-] + [COO^-; H–C–OH; CH_2O P]

Dióxido de carbono — Ribulose 1,5-bifosfato — Intermediário — Duas moléculas de 3-fosfoglicerato

Figura14-36 A fixação do carbono envolve a formação de uma ligação covalente que liga o dióxido de carbono a ribulose 1,5-bifosfato. A reação é catalisada no estroma do cloroplasto pela enzima ribulose-bifosfato-carboxilase, abundantemente presente. Como apresentado, o produto são duas moléculas de 3-fosfoglicerato.

outras enzimas (processando cerca de três moléculas do substrato por segundo comparado com 1.000 moléculas por segundo de uma enzima típica), um grande número de moléculas dessa enzima são necessárias no vegetal. A ribulose-bifosfato-carboxilase frequentemente representa mais de 50% do total de proteínas do cloroplasto e é amplamente reconhecida como a mais abundante proteína no planeta.

Quando carboidratos são quebrados e oxidados a CO_2 e H_2O nas células, uma grande quantidade de energia livre é liberada. Nitidamente, a reação inversa – na qual o CO_2 e a H_2O se combinam para produzir carboidratos durante a fotossíntese – deve ser energeticamente muito desfavorável. Para que essa reação possa ocorrer, ela deve estar acoplada a uma reação energeticamente favorável que a promova. A reação na qual o CO_2 é fixado pela Rubisco é, de fato, energeticamente favorável, mas somente porque ela recebe um fornecimento contínuo do composto rico em energia ribulose-1,5-bifosfato, onde cada molécula de CO_2 é adicionada (ver Figura 14-36). A energia e o poder redutor necessários para a elaborada via metabólica, onde os compostos são regenerados, provém do ATP e do NADPH produzidos nas reações luminosas da fotossíntese.

As séries de reações que possibilitam que as células incorporem o CO_2 em açúcares formam um ciclo que inicia e termina com a ribulose 1,5-bifosfato (**Figura 14-37**). Para cada três moléculas de CO_2 que entram no ciclo, uma nova molécula de *gliceraldeído 3-fosfato* é produzida – o açúcar de três carbonos, que é o produto líquido do ciclo – e três moléculas de ATP e duas moléculas de NADPH são consumidas. O gliceraldeído 3-fosfato é o material de partida para a síntese de muitos outros açúcares e moléculas orgânicas. O *ciclo de fixação do carbono* (ou ciclo de Calvin) foi desvendado nas décadas de 1940 e 1950, em uma das primeiras aplicações com sucesso de radioisótopos como rastreadores em bioquímica.

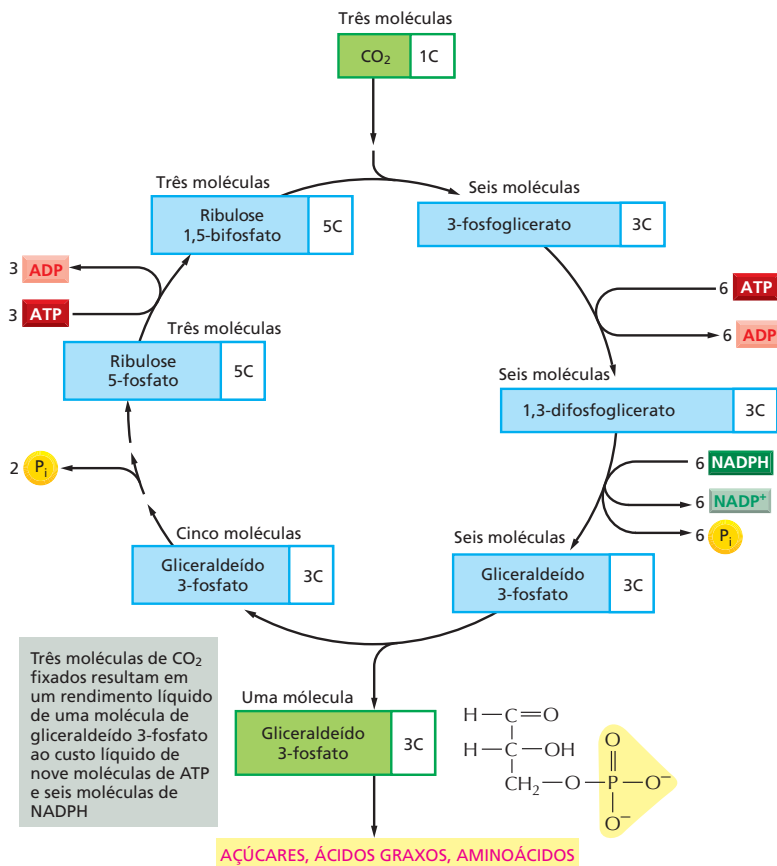



Figura 14-37 O ciclo de fixação do carbono forma moléculas orgânicas a partir de CO_2 e H_2O. O ciclo inicia com a reação apresentada na Figura 14-36, produzindo gliceraldeído 3-fosfato. O número de átomos de carbono em cada tipo de molécula está indicado na *caixa branca*. Há muitos intermediários entre o gliceraldeído 3-fosfato e a ribulose 5-fosfato, mas eles foram aqui omitidos para maior clareza. A entrada de água no ciclo não está representada.

Figura 14-38 Nos vegetais, os cloroplastos e as mitocôndrias colaboram para suprir as células com metabólitos e ATP. A membrana interna dos cloroplastos é impermeável ao ATP e ao NADPH que são produzidos durante as reações luminosas da fotossíntese. Essas moléculas são direcionadas para o ciclo de fixação do carbono, onde são utilizadas na produção de açúcares. Os açúcares resultantes são então armazenados no interior do cloroplasto – na forma de amido – ou exportados para o restante da célula vegetal. Assim, eles podem entrar na via de geração de energia que termina na produção de ATP pela mitocôndria. As membranas mitocondriais são permeáveis ao ATP, como indicado.

QUESTÃO 14-10

A. Como as células das raízes dos vegetais sobrevivem, uma vez que elas não possuem cloroplastos e não estão expostas à luz?

B. Diferentemente das mitocôndrias, os cloroplastos não possuem um transportador que permita a exportação de ATP para o citosol. Como as células vegetais podem obter a ATP de que necessitam para conduzir as suas reações metabólicas dependentes de energia no citosol?

Os açúcares gerados pela fixação de carbono podem ser armazenados como amido ou utilizados para produzir ATP

O gliceraldeído 3-fosfato produzido pela fixação do carbono nos cloroplastos pode ser utilizado de diferentes maneiras, dependendo da necessidade dos vegetais. Durante períodos de excesso de atividade fotossintética, o gliceraldeído 3-fosfato é retido no cloroplasto, onde ele é convertido em *amido* no estroma (**Figura 14-38**). Assim como o glicogênio nas células animais, o amido é um grande polímero de glicose que serve como reserva de carboidratos. O amido é produzido e armazenado como grandes grânulos no estroma do cloroplasto (ver Figura 14-25B). À noite, o amido é degradado em açúcares para auxiliar na sustentação das necessidades metabólicas do vegetal. O amido constitui uma parte importante das dietas de todos os animais que se alimentam das plantas.

O cloroplasto não é meramente um depósito de armazenamento. A maior parte do gliceraldeído 3-fosfato produzido nos cloroplastos é movida para o citosol, para fora do cloroplasto. Parte dele entra na via glicolítica (ver Figura 13-5), sendo convertido em piruvato. Então, esse piruvato entra no ciclo do ácido cítrico na mitocôndria da célula vegetal e leva a produção de ATP pela fosforilação oxidativa (ver Figura 14-38). Esse é o ATP que a planta utiliza para o seu metabolismo geral, sendo sintetizado na mitocôndria da mesma forma que nas células animais e em outros organismos não fotossintéticos.

O gliceraldeído 3-fosfato exportado dos cloroplastos pode também ser convertido em muitos outros metabólitos, incluindo o dissacarídeo *sacarose*. A sacarose é a principal forma na qual o açúcar é transportado entre as células vegetais: assim como a glicose é transportada no sangue dos animais, a sacarose é exportada das folhas, pelos feixes vasculares, para fornecer carboidratos para o restante do vegetal.

AS ORIGENS DOS CLOROPLASTOS E DAS MITOCÔNDRIAS

Hoje é bastante aceito que os cloroplastos e as mitocôndrias tenham evoluído de bactérias que foram engolfadas por células eucarióticas ancestrais há mais de um bilhão de anos (ver Figuras 1-19 e 1-21). Como uma relíquia desse passado evolucionário, os dois tipos de organelas contêm seus próprios genomas, assim como sua própria maquinaria biossintética para produzir RNA e as proteínas da organela. O modo como as mitocôndrias e os cloroplastos se reproduzem – por crescimento e divisão de organelas preexistentes – fornece evidência adicional de sua descendência bacteriana (**Figura 14-39**).

O crescimento e a proliferação de mitocôndrias e de cloroplastos são, contudo, complicados pelo fato de seus componentes proteicos serem codificados por dois sistemas genéticos separados – um na organela e um no núcleo celular.

Figura 14-39 Uma mitocôndria se divide como uma bactéria. (A) Ocorre tanto a fissão quanto a fusão mitocondrial. O processo de fissão é conceitualmente semelhante ao processo de divisão bacteriana. (B) Uma microfotografia eletrônica de uma mitocôndria em divisão em uma célula hepática. (B, cortesia de Daniel S. Friend.)

No caso da mitocôndria, a maior parte dos genes bacterianos originais foi transportada para o núcleo celular, deixando apenas alguns poucos genes remanescentes dentro da própria organela. De fato, as mitocôndrias animais contêm um sistema genético simples: o genoma mitocondrial humano, por exemplo, contém somente 16.569 pares de nucleotídeos, contendo 37 genes. A maioria das proteínas mitocondriais – incluindo aquelas necessárias para formar a RNA-polimerase mitocondrial, as proteínas ribossomais e todas as enzimas do ciclo do ácido cítrico – é produzida a partir de genes nucleares, e essas proteínas devem, portanto, ser importadas pelas mitocôndrias a partir do citosol, onde são produzidas (discutido no Capítulo 15).

Assim como a mitocôndria, o cloroplasto possui muito dos seus próprios genes, bem como sistemas completos de transcrição e tradução que são necessários para produzir proteínas a partir desses genes. Os genomas cloroplásticos são consideravelmente maiores do que os genomas mitocondriais: nas plantas superiores, por exemplo, o genoma cloroplástico contém cerca de 120 genes em 120.000 pares de nucleotídeos. Esses genes são marcadamente semelhantes aos genes de cianobactéria, a bactéria fotossintetizante da qual se acredita que os cloroplastos sejam derivados. Mesmo assim, muitas proteínas cloroplásticas são hoje codificadas por genes nucleares e devem ser importadas a partir do citosol.

As mesmas técnicas que nos têm permitido analisar os genomas de mitocôndrias e de cloroplastos também nos permitiram identificar e explorar a biologia molecular de muitos microrganismos na Terra. Alguns desses organismos crescem nos hábitats mais inóspitos do planeta. Esses incluem fontes termais sulfurosas ou fendas hidrotérmicas do solo oceânico. Nesses aparentemente bizarros microrganismos modernos, podemos facilmente encontrar vestígios da história da vida – na forma das muitas moléculas das quais eles são constituídos. Como impressões digitais deixadas na cena de um crime, essas moléculas fornecem fortes evidências que nos permitem traçar a história de eventos remotos, permitindo especulações sobre a origem de sistemas geradores de ATP que são encontrados nas mitocôndrias e nos cloroplastos de hoje. Por conseguinte, terminaremos este capítulo com uma discussão sobre a evolução dos sistemas captadores de energia que foram discutidos em detalhes previamente.

A fosforilação oxidativa deve ter fornecido uma vantagem evolutiva às antigas bactérias

Como já mencionado, as primeiras células vivas da Terra – tanto procariotos quanto eucariotos primitivos – muito provavelmente consumiam moléculas orgânicas produzidas geoquimicamente e geravam ATP pela fermentação. Em

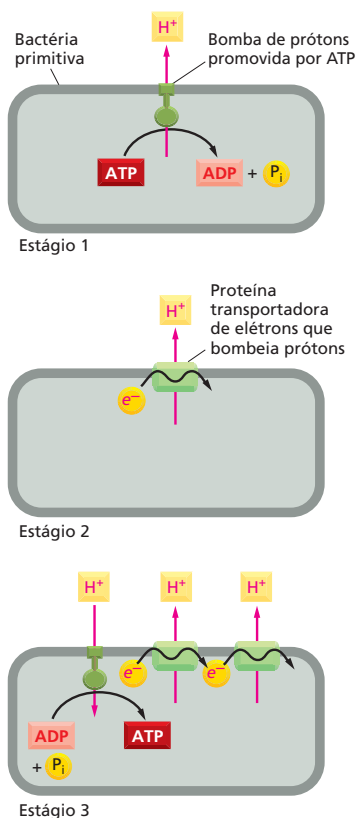



Figura 14-40 A fosforilação oxidativa deve ter evoluído em estágios. O primeiro estágio poderia ter evoluído de uma ATPase que bombeava prótons para fora da célula utilizando a energia da hidrólise do ATP; o estágio 2 poderia ter evoluído de uma bomba de prótons diferente, promovida por uma cadeia transportadora de elétrons; o estágio 3 seria a união desses dois sistemas para gerar uma ATP-sintase que utiliza os prótons bombeados para sintetizar ATP. Uma bactéria com esse sistema final teria uma vantagem seletiva sobre as bactérias com apenas um dos sistemas ou nenhum deles.

virtude da falta do oxigênio na atmosfera, as reações anaeróbias de fermentação devem ter excretado ácidos orgânicos – como ácido láctico ou fórmico, por exemplo – no meio ambiente (ver Figura 13-4A).

Essa excreção de ácidos orgânicos provavelmente baixou o pH do ambiente, favorecendo a sobrevivência de células que tivessem desenvolvido proteínas transmembrânicas capazes de bombear H^+ para fora do citosol, protegendo a célula de tornar-se ácida demais (estágio 1 na **Figura 14-40**). Uma dessas bombas pode ter usado a energia disponível da hidrólise de ATP para ejetar H^+ da célula; tal bomba proteica poderia ter sido o ancestral da ATP-sintase de hoje.

À medida que o suprimento de nutrientes fermentáveis da Terra começou a decrescer, os organismos que podiam encontrar um meio de bombear H^+ sem consumir ATP estariam em vantagem: eles poderiam armazenar a pequena quantidade de ATP derivada da fermentação de nutrientes para prover outras atividades celulares importantes. Pressões seletivas, como a escassez de nutrientes, podem, portanto, ter levado à evolução das primeiras proteínas transportadoras de elétrons; essas proteínas carreadoras permitiriam que as células usassem o movimento de elétrons entre moléculas de diferentes potenciais redox como a fonte de energia para o transporte de H^+ pela membrana plasmática (estágio 2 na Figura 14-40). Algumas dessas células podem ter usado os ácidos orgânicos não fermentáveis que as células vizinhas tinham excretado para fornecer os elétrons necessários para alimentar o sistema. Algumas bactérias de hoje crescem em ácido fórmico, por exemplo, usando a pequena quantia de energia redox derivada da transferência de elétrons do ácido fórmico para o fumarato para bombear H^+.

Eventualmente, algumas bactérias teriam desenvolvido sistemas transportadores de elétrons bombeadores de H^+, os quais seriam tão eficientes que poderiam captar mais energia redox do que a necessária para manter seu pH interno. Essas células muito provavelmente geravam grandes gradientes eletroquímicos de prótons, os quais poderiam então ser usados para produzir ATP. Os prótons poderiam escoar de volta para o interior da célula por meio de bombas de H^+ promovidas por ATP (estágio 3 na Figura 14-40). Uma vez que essas células requeriam muito menos do cada vez mais escasso suprimento de nutrientes fermentáveis, elas teriam proliferado às custas de seus vizinhos.

As bactérias fotossintetizantes exigiram ainda menos dos seus ambientes

O maior avanço evolutivo em metabolismo energético, no entanto, foi provavelmente a formação de centros de reação fotoquímica que podiam usar a energia da luz solar para produzir moléculas como a NADH. Acredita-se que esse desenvolvimento ocorreu no começo do processo de evolução celular – há mais de 3 bilhões de anos, nos ancestrais das bactérias verdes sulfurosas. As bactérias verdes sulfurosas de hoje usam a energia luminosa para transferir átomos de hidrogênio (um elétron mais um próton) do H_2S para a NADPH, criando, dessa forma, o forte poder redutor necessário para a fixação do carbono (**Figura 14-41**).

O próximo passo, o qual se acredita ter ocorrido com o avanço das cianobactérias (ver Figura 14-24), foi a evolução de organismos capazes de utilizar a água como fonte de elétrons para a fotossíntese. Isso acarretou a evolução de uma enzima que quebra a água e a adição de um segundo fotossistema, agindo em *tandem* com o primeiro, para superar a enorme diferença em potencial redox entre H_2O e NADPH (ver Figura 14-33). As consequências biológicas desse passo evolutivo foram de longo alcance. Pela primeira vez, havia organismos que faziam apenas mínimas demandas químicas de seu ambiente. Essas células poderiam propagar-se e evoluir de modos negados às antigas bactérias fotossintetizantes, que necessitavam de H_2S e ácidos orgânicos como fonte de elétrons.

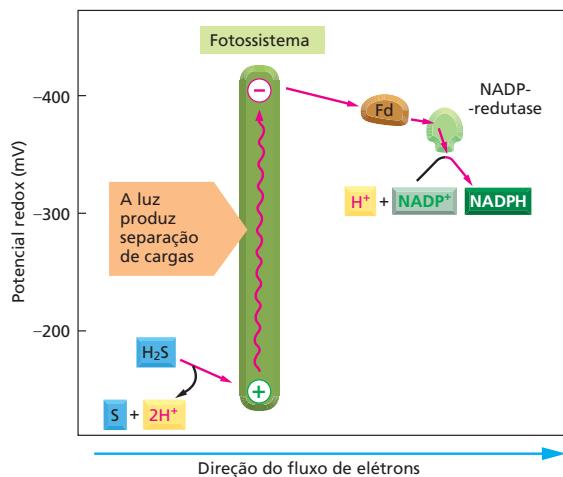



Figura 14-41 A fotossíntese nas bactérias verdes sulfurosas utiliza o sulfito de hidrogênio (H_2S) como doador de elétrons em detrimento da água. Os elétrons são mais facilmente retirados do H_2S do que da água, pois o H_2S possui um potencial redox muito maior (ver Figura 14-33). Contudo, somente um fotossistema é necessário para produzir NADPH, sendo formado como subproduto o enxofre elementar, em vez do O_2. A fotossíntese na bactéria verde sulfurosa se assemelha à do fotossistema I em plantas e cianobactérias. Os dois fotossistemas usam uma série de centros ferro-enxofre como aceptores de elétrons que, eventualmente, doam seus elétrons de alta energia à ferredoxina (Fd). Um exemplo de uma bactéria desse tipo é a *Chlorobium tepidum,* que pode prosperar a temperaturas altas e a baixa intensidade de luz nas fontes termais.

Em consequência disso, acumularam-se grandes quantidades de material orgânico fermentável sintetizado biologicamente. Além disso, o oxigênio foi introduzido na atmosfera pela primeira vez (**Figura 14-42**).

A disponibilidade de O_2 tornou possível o desenvolvimento de bactérias que dependem do metabolismo aeróbio para produzir ATP. Como explicado anteriormente, esses organismos poderiam captar a grande quantidade de energia liberada pela quebra de carboidratos e outras moléculas orgânicas reduzidas até CO_2 e H_2O.

Como o material orgânico acumulava como um subproduto da fotossíntese, algumas bactérias fotossintetizantes – incluindo os ancestrais da *E. coli* – perderam sua habilidade de sobreviver apenas de energia luminosa e passaram a depender inteiramente da respiração celular. As mitocôndrias surgiram, provavelmente, quando uma célula eucariótica primitiva endocitou uma dessas bactérias dependentes de respiração. E as plantas surgiram um pouco mais tarde, quando um descendente desses eucariotos aeróbios primitivos capturou

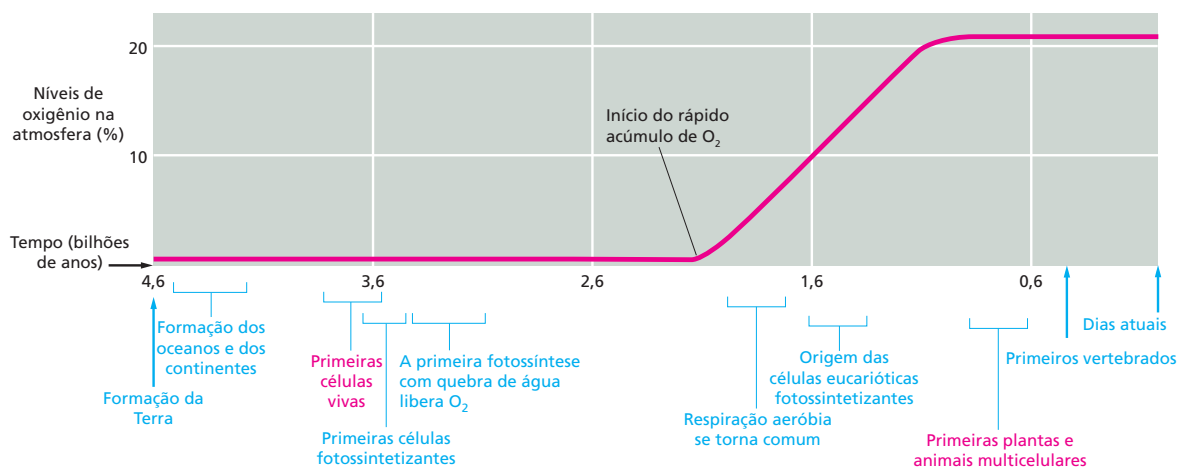



Figura 14-42 A vida na Terra evoluiu por bilhões de anos. Com a evolução dos processos de fotossíntese com base em membranas, há mais de 3 bilhões de anos, os organismos não eram mais dependentes de químicos orgânicos pré-formados. Eles eram capazes agora de produzir suas próprias moléculas orgânicas a partir do gás CO_2. Acredita-se que a demora de mais de um bilhão de anos entre o surgimento da bactéria capaz de quebrar a água e liberar O_2 durante a fotossíntese e o acúmulo de altos níveis de O_2 na atmosfera é devida à reação inicial do oxigênio com o abundante ferro (Fe^{2+}) dissolvido nos oceanos primitivos. Apenas quando o ferro foi esgotado, o oxigênio teria começado a acumular-se na atmosfera. Em resposta ao aumento da quantidade de oxigênio na atmosfera, organismos não fotossintéticos consumidores de oxigênio apareceram, e a concentração de oxigênio na atmosfera se equilibrou.

uma bactéria fotossintetizante, a qual se tornou o precursor dos cloroplastos. Uma vez que os eucariotos adquiriram os simbiontes bacterianos que se tornaram mitocôndrias e cloroplastos, eles poderiam, então, embarcar no fantástico caminho da evolução que, finalmente, levou aos organismos multicelulares complexos.

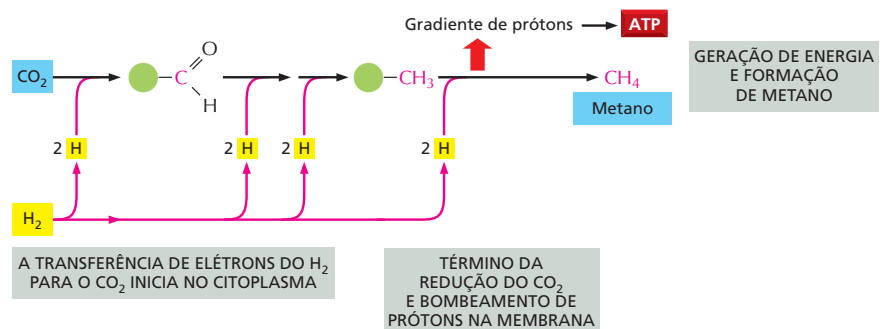
O estilo de vida do *Methanococcus* sugere que o acoplamento quimiosmótico seja um processo antigo

As condições de hoje que mais se assemelham àquelas sob as quais se acredita que as células viviam há 3,5-3,8 bilhões de anos podem ser as das fendas hidrotérmicas das profundidades oceânicas. Essas fendas representam lugares onde o manto fundido da Terra está quebrando através da crosta, expandindo a largura do solo oceânico. De fato, os organismos modernos que aparentam ser os mais próximos a essas células hipotéticas das quais toda a vida evoluiu vivem a altas temperaturas (75 a 95°C, perto da temperatura da água em ebulição). Essa habilidade de prosperar em tais temperaturas extremas sugere que o ancestral comum da vida – a célula que originou Bacteria, Archaea e Eukarya – viveu sob condições anaeróbias muito quentes.

Uma dessas Archaea que vive hoje nesse ambiente é o *Methanococcus jannaschii.* Originalmente isolado de uma fenda hidrotérmica há mais de 1.600 m abaixo da superfície do oceano, os organismos crescem inteiramente com nutrientes inorgânicos em completa ausência de luz e oxigênio gasoso, utilizando como nutrientes gás hidrogênio (H_2), CO_2 e gás nitrogênio (N_2) que borbulham da fenda. Seu modo de existência nos dá um sinal de como as células primitivas podem ter usado o transporte de elétrons para obter sua energia e suas moléculas de carbono de materiais inorgânicos que eram abundantemente disponíveis na quente Terra primitiva.

O *Methanococcus* depende do gás N_2 como sua fonte de nitrogênio para moléculas como aminoácidos. O organismo reduz N_2 à amônia (NH_3) pela adição de hidrogênio, um processo chamado de **fixação de nitrogênio**. A fixação de nitrogênio requer uma grande quantidade de energia, assim como o processo de fixação de carbono quando a bactéria precisa converter CO_2 em açúcares. A maior parte da energia requerida para ambos os processos é derivada da transferência de elétrons do H_2 para o CO_2, com a liberação de grandes quantidades de metano (CH_4) como subproduto (portanto, produzindo gás natural e dando ao organismo o seu nome, **Figura 14-43**). Parte dessa transferência de elétrons ocorre na membrana e resulta no bombeamento de prótons (H^+) através dela. O gradiente eletroquímico de prótons resultante promove uma ATP-sintase da mesma membrana a produzir ATP.

O fato de tal acoplamento quimiosmótico existir em um organismo tão primitivo como o *Methanococcus* sugere que o armazenamento de energia derivado do transporte de elétrons em um gradiente de H^+ é um processo extremamente antigo. Assim, acredita-se que o acoplamento quimiosmótico tenha sustentado a evolução de quase todas as formas de vida na Terra.

Figura 14-43 O *Methanococcus* utiliza o acoplamento quimiosmótico para gerar energia. Esta Archaea das profundidades oceânicas usa o gás hidrogênio (H_2) como fonte de poder redutor para gerar energia. A etapa inicial de redução ocorre por reações catalisadas por enzimas no citoplasma. Em contrapartida, a etapa final de redução envolve uma transferência de elétrons com base em membranas que gera um gradiente de prótons, o qual conduz a síntese de ATP enquanto produz metano como subproduto. Os círculos *verdes* representam coenzimas especiais às quais os intermediários metabólicos estão ligados.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- As mitocôndrias, os cloroplastos e muitas bactérias produzem ATP por um mecanismo fundamentado em membranas conhecido como acoplamento quimiosmótico.
- As mitocôndrias produzem a maior parte do ATP das células animais, utilizando a energia derivada da oxidação de açúcares e ácidos graxos.
- As mitocôndrias possuem uma membrana interna e outra externa. A membrana interna envolve a matriz mitocondrial, um compartimento que possui muitas enzimas, incluindo aquelas do ciclo do ácido cítrico. Essas enzimas produzem grandes quantidades de NADH e $FADH_2$ a partir da oxidação da acetil-CoA.
- Na membrana mitocondrial interna, os elétrons de alta energia doados pela NADH e pela $FADH_2$ passam através de uma cadeia transportadora de elétrons (a cadeia respiratória), às vezes se combinando com o oxigênio molecular (O_2) em uma reação energeticamente favorável.
- Grande parte da energia liberada pelas transferências de elétrons ao longo da cadeia respiratória é aproveitada para bombear H^+ para fora da matriz, consequentemente criando um gradiente eletroquímico de prótons (H^+) transmembrânico. O bombeamento de prótons é conduzido por três grandes complexos enzimáticos respiratórios embebidos na membrana.
- O gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna resultante é então aproveitado para produzir ATP pelo refluxo de H^+ para a matriz, através da ATP-sintase, uma enzima localizada na membrana mitocondrial interna.
- O gradiente eletroquímico de prótons também promove o transporte ativo de metabólitos para dentro e para fora da mitocôndria.
- Na fotossíntese em cloroplastos e em bactérias fotossintetizantes, elétrons de alta energia são gerados quando a luz solar é absorvida pela clorofila; essa energia é capturada por complexos proteicos conhecidos por fotossistemas, os quais estão localizados na membrana do tilacoide dos cloroplastos.
- Cadeias transportadoras de elétrons associadas aos fotossistemas transferem elétrons da água para o $NADP^+$ para formar o NADPH. O O_2 é gerado como subproduto.
- Cadeias transportadoras de elétrons nos cloroplastos também geram um gradiente de prótons pela membrana do tilacoide. Assim como na mitocôndria, esse gradiente eletroquímico de prótons é utilizado pela ATP-sintase, embebida na membrana, para gerar ATP.
- O ATP e o NADPH produzidos durante a fotossíntese são utilizados no cloroplasto para direcionar o ciclo de fixação de carbono no estroma cloroplástico, produzindo, consequentemente, carboidratos a partir do CO_2.
- Os carboidratos são então exportados para o citosol, onde são metabolizados para fornecer carbono orgânico, ATP (principalmente via mitocôndrias) e força redutora para o restante da célula.
- Acredita-se que tanto as mitocôndrias quanto os cloroplastos evoluíram de bactérias que foram endocitadas por células eucarióticas primitivas. As duas mantêm seu próprio genoma e se dividem por processos que se assemelham à divisão celular bacteriana.
- Os mecanismos de acoplamento quimiosmótico estão amplamente espalhados e são de origem muito antiga. Microrganismos modernos que vivem em ambientes semelhantes àqueles que, acredita-se, existiam na Terra primitiva também utilizam o acoplamento quimiosmótico para produzir ATP.

TERMOS-CHAVE

complexo antena
ATP-sintase
fixação de carbono
acoplamento quimiosmótico
clorofila
cloroplasto
fotofosforilação cíclica
citocromo
citocromo-oxidase
cadeia transportadora de elétrons
centro ferro-enxofre
matriz
mitocôndria
fixação de nitrogênio
fosforilação oxidativa
fotossíntese
fotossistema
quinona
centro de reação
par redox
potencial redox
reação redox
estroma

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 14-11

Quais das afirmações a seguir estão corretas? Explique suas respostas.

A. Após um elétron ter sido removido pela luz, a afinidade por elétrons da clorofila carregada positivamente no centro de reação do primeiro fotossistema (fotossistema II) é comparativamente maior do que a afinidade por elétrons do O_2.

B. A fotossíntese é a transferência, promovida pela luz, de um elétron da clorofila para uma segunda molécula com afinidade muito menor por elétrons.

C. Em virtude da necessidade da absorção de quatro fótons para que ocorra a liberação de uma molécula de O_2, a partir de duas moléculas de H_2O, a enzima que quebra a água tem de manter os intermediários da reação firmemente ligados para prevenir reduções parciais e, portanto, minimizar o risco de escape de radicais superóxido.

QUESTÃO 14-12

Quais das afirmações a seguir estão corretas? Explique suas respostas.

A. Muitas, porém não todas, reações de transferência de elétrons envolvem íons metálicos.

B. A cadeia transportadora de elétrons gera um potencial elétrico através da membrana porque move elétrons do espaço intermembranas para a matriz.

C. O gradiente eletroquímico de prótons consiste em dois componentes: uma diferença de pH e um potencial elétrico.

D. A ubiquinona e o citocromo *c* são carreadores difusíveis de elétrons.

E. As plantas possuem cloroplastos e, portanto, podem sobreviver sem mitocôndrias.

F. Tanto a clorofila quanto o grupo heme contém um extenso sistema de ligações duplas que permitem absorver a luz visível.

G. A função da clorofila na fotossíntese é equivalente àquela do grupo heme no transporte mitocondrial de elétrons.

H. A maior parte do peso seco de uma árvore é devido a minerais captados pelas raízes.

QUESTÃO 14-13

Um único próton que se move a favor do gradiente eletroquímico para o espaço da matriz mitocondrial libera 4,6 kcal/mol de energia livre. Quantos prótons devem fluir através da membrana mitocondrial interna para sintetizar uma molécula de ATP se a ΔG para a síntese de ATP sob as condições intracelulares está entre 11 e 13 kcal/mol? (A ΔG foi discutida no Capítulo 3, p. 91-98.) Por que é dada uma aproximação para esse último valor, e não um número preciso? Sob que condições o valor mais baixo seria aplicado?

QUESTÃO 14-14

Na afirmação seguinte, escolha a alternativa correta em itálicos e justifique a sua resposta. "Se não houver O_2 disponível, todos os componentes da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial se acumularão nas suas formas *reduzidas/oxidadas*. Se O_2 for adicionado novamente, os carreadores de elétrons na citocromo-oxidase se tornarão *reduzidos/oxidados antes/depois* daqueles da NADH-desidrogenase".

QUESTÃO 14-15

Suponha que a conversão de ubiquinona oxidada à ubiquinona reduzida, pela NADH-desidrogenase, ocorra na matriz da membrana mitocondrial interna e que a oxidação dessa, pelo citocromo *b*-c_1, ocorra no espaço intermembranas (ver Figuras 14-9 e 14-19). Quais são as consequências desse arranjo para a geração do gradiente de H^+ através da membrana?

QUESTÃO 14-16

Se uma voltagem é aplicada em dois eletrodos de platina imersos em água, moléculas de água são quebradas nos gases H_2 e O_2. No eletrodo negativo, os elétrons são doados, e o gás H_2 é liberado; no eletrodo positivo, elétrons são captados, e o gás O_2 é produzido. Quando bactérias fotossintetizantes e células vegetais quebram as moléculas de água, elas produzem somente O_2 e não H_2. Por quê?

QUESTÃO 14-17

Em um criterioso experimento realizado na década de 1960, cloroplastos foram primeiramente embebidos em uma solução ácida de pH 4, de forma que o estroma e o espaço do tilacoide

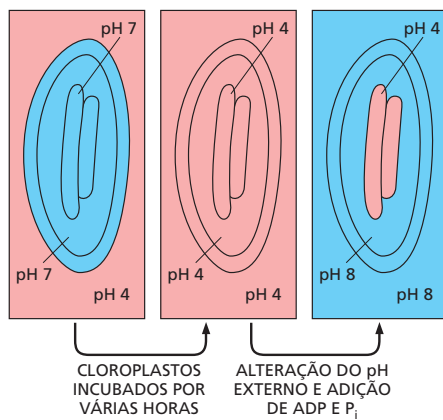



Figura Q14-17

foram acidificados (**Figura Q14-17**). Eles foram então transferidos para uma solução básica (pH 8). Isso levou a um rápido aumento do pH do estroma para 8, permanecendo o espaço do tilacoide temporariamente com pH 4. Uma explosão de síntese de ATP foi observada, e a diferença de pH entre o tilacoide e o estroma desapareceu.

A. Explique por que essas condições levaram à síntese de ATP.

B. É necessário luz para que ocorra o experimento?

C. O que aconteceria se as soluções fossem trocadas, de forma que a primeira incubação fosse na solução de pH 8, e a segunda, na solução de pH 4?

D. O experimento confirma ou questiona o modelo quimiosmótico?
Explique as suas respostas.

QUESTÃO 14-18

Como seu primeiro experimento em um laboratório, o seu orientador lhe solicita que faça a reconstituição de bacteriorrodopsina purificada, uma bomba de H^+ promovida pela luz obtida de membranas plasmáticas de bactérias fotossintetizantes e ATP-sintase, purificada de mitocôndrias do coração de bovino, juntas nas mesmas membranas de vesículas – como apresentado na **Figura Q14-18**. Você deve, então, adicionar ADP e P_i ao meio externo e irradiar luz sobre a suspensão de vesículas.

A. O que você observa?

B. O que você observa se nem todo o detergente é removido, e as membranas das vesículas permanecem permeáveis aos íons?

C Você descreve a um amigo, durante o jantar, os seus novos experimentos, e ele pergunta a validade de um ensaio que utiliza componentes tão divergentes, de organismos tão pouco relacionados: "Por que alguém iria misturar baunilha de pudim com óleo de freios?". Defenda os seus ensaios contra a crítica.

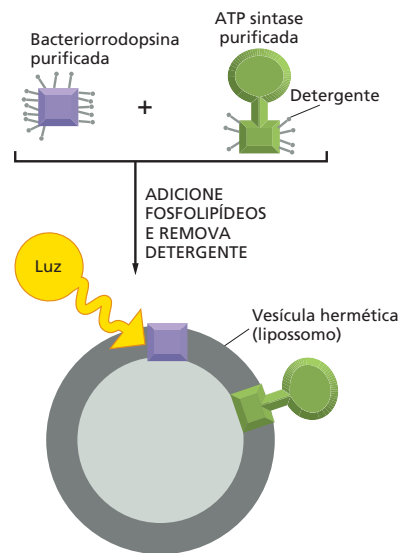
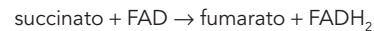
QUESTÃO 14-19

A $FADH_2$ é produzida no ciclo do ácido cítrico por um complexo enzimático embebido na membrana, chamado de succinato-desidrogenase, que contém FAD ligada e conduz as reações:

Figura Q14-18

$$\text{succinato} + \text{FAD} \rightarrow \text{fumarato} + \text{FADH}_2$$

e

$$\text{FADH}_2 \rightarrow \text{FAD} + 2\text{H}^+ + 2e^-$$

O potencial redox da $FADH_2$, entretanto, é de somente –220 mV. Com referência ao Painel 14-1 (p. 471) e à Figura 14-20, sugira um mecanismo plausível pelo qual os elétrons poderiam ser alimentados para a cadeia transportadora de elétrons. Desenhe um diagrama para ilustrar o seu mecanismo proposto.

QUESTÃO 14-20

Algumas bactérias se tornaram especializadas para viver em ambientes de alto pH (pH ~10). Você supõe que essas bactérias utilizam um gradiente de prótons através das suas membranas plasmáticas para produzir ATP? (Pista: todas as células devem manter os seus citoplasmas em um pH próximo à neutralidade.)

QUESTÃO 14-21

A **Figura Q14-21** resume o circuito utilizado pelas mitocôndrias e cloroplastos para interconverter diferentes formas de energia. Está correto afirmar

A. que os produtos dos cloroplastos são os substratos para as mitocôndrias?

B. que a ativação de elétrons pelos fotossistemas permite aos cloroplastos promover a transferência de elétrons da H_2O para carboidratos, o qual é oposto à direção da transferência de elétrons na mitocôndria?

C. que o ciclo do ácido cítrico é inverso ao ciclo normal de fixação do carbono?

QUESTÃO 14-22

Um manuscrito foi submetido para publicação em um prestigioso jornal científico. No trabalho, os autores descrevem um experimento no qual eles foram capazes de aprisionar uma molécula

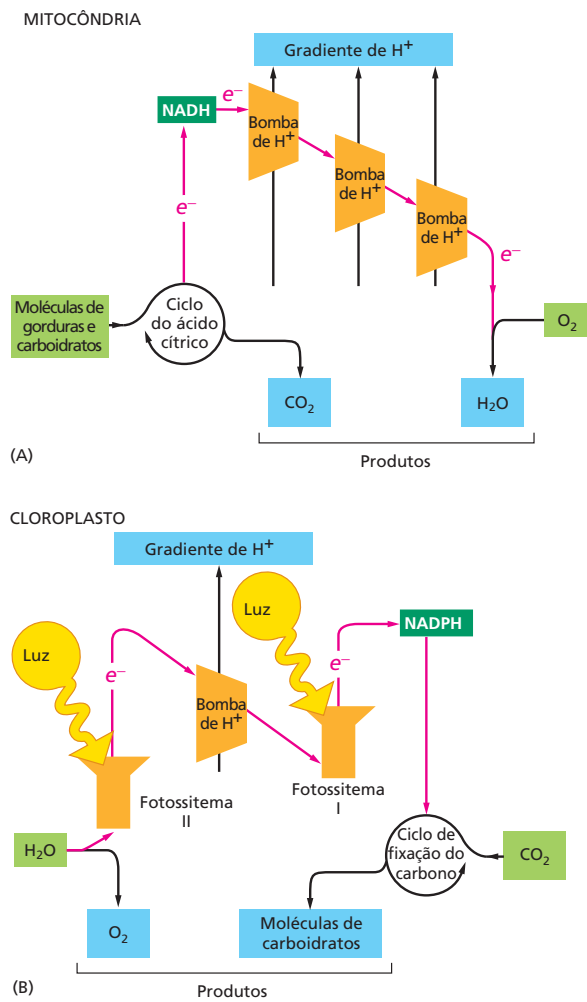



Figura Q14-21

de ATP-sintase e rodar, mecanicamente, a sua cabeça aplicando uma força sobre ela. Os autores demonstram que, ao rodar a cabeça da ATP-sintase, o ATP é produzido, na ausência de um gradiente de H^+. O que isso significaria acerca do mecanismo pelo qual funciona a ATP-sintase? Esse manuscrito deveria ser considerado para publicação em um dos melhores jornais científicos?

QUESTÃO 14-23

Você mistura os seguintes componentes em uma solução. Assumindo que os elétrons devem fluir pela rota especificada na Figura 14-9, em quais experimentos você esperaria uma transferência líquida de elétrons para o citocromo *c*? Discuta por que não ocorre transferência de elétrons em outros experimentos.

A. Ubiquinona reduzida e citocromo *c* oxidado
B. Ubiquinona oxidada e citocromo *c* oxidado
C. Ubiquinona reduzida e citocromo *c* reduzido
D. Ubiquinona oxidada e citocromo *c* reduzido
E. Ubiquinona reduzida, citocromo *c* oxidado e complexo citocromo b-c_1
F. Ubiquinona oxidada, citocromo *c* oxidado e complexo do citocromo b-c_1
G. Ubiquinona reduzida, citocromo *c* reduzido e complexo citocromo b-c_1
H. Ubiquinona oxidada, citocromo *c* reduzido e complexo citocromo b-c_1

CAPÍTULO 15

Compartimentos Intracelulares e Transporte

Em qualquer momento, uma típica célula eucariótica está conduzindo milhares de diferentes reações químicas, muitas das quais são mutuamente incompatíveis. Uma série de reações produz glicose, por exemplo, ao passo que outra degrada glicose; algumas enzimas sintetizam ligações peptídicas, ao passo que outras as hidrolisam, e assim por diante. De fato, se as células de um órgão como o fígado fossem rompidas e seus constituintes misturados em um mesmo tubo de ensaio, um caos químico resultaria, e as enzimas celulares e outras proteínas seriam rapidamente degradadas pelas suas próprias enzimas proteolíticas. Para que a célula opere de modo eficaz, os diversos processos intracelulares que ocorrem simultaneamente devem, de alguma forma, ser segregados.

As células desenvolveram várias estratégias para segregar e organizar as suas reações químicas. Uma estratégia utilizada tanto pelas células procarióticas como pelas eucarióticas é agregar as diferentes enzimas requeridas para catalisar uma determinada sequência de reações em um grande complexo proteico. Esses complexos multiproteicos são utilizados, por exemplo, na síntese de DNA, RNA e proteínas. Uma segunda estratégia, a qual é muito mais desenvolvida em células eucarióticas, consiste em confinar os diferentes processos metabólicos, e as proteínas necessárias para conduzi-los, dentro de compartimentos envoltos por membranas. Como discutido nos Capítulos 11 e 12, as membranas celulares fornecem barreiras seletivamente permeáveis pelas quais o transporte da maior parte das moléculas pode ser controlado. Neste capítulo, consideraremos a estratégia de formação de compartimentos e algumas de suas consequências.

Na primeira seção, descreveremos os principais compartimentos envoltos por membranas, ou *organelas envoltas por membranas,* de células eucarióticas e consideraremos, brevemente, as suas principais funções. Na segunda seção, discutiremos como a composição proteica dos diferentes compartimentos é definida e mantida. Cada compartimento contém um conjunto único de proteínas, as quais devem ser transferidas seletivamente a partir do citosol, onde são pro-

Figura 15-1 Em células eucarióticas, membranas internas criam compartimentos fechados e organelas nas quais diferentes processos metabólicos são segregados. Exemplos de muitas das principais organelas envoltas por membranas podem ser observados nesta microfotografia eletrônica de parte de uma célula hepática, vista em secção transversal. Os pequenos grânulos pretos visualizados entre os compartimentos envoltos por membranas são agregados de glicogênio e as enzimas que controlam a sua síntese e degradação. (Cortesia de Daniel S. Friend.)

duzidas, para o compartimento no qual elas são utilizadas. Esse processo de transferência, chamado de *distribuição proteica,* depende de sinais construídos dentro da sequência de aminoácidos das proteínas. Na terceira seção, descreveremos como certos compartimentos envoltos por membranas de uma célula eucariótica se comunicam com outros pela formação de pequenos sacos membranosos, ou *vesículas.* Esses se destacam de um compartimento, movem-se pelo citosol e se fundem com outro compartimento em um processo chamado de *transporte vesicular.* Nas duas últimas seções, discutiremos como esse tráfego constante de vesículas também fornece as principais rotas para a liberação de proteínas da célula pelo processo de *exocitose* e pela sua importação pelo processo de *endocitose.*

Figura 15-2 Uma célula do revestimento do intestino contém o conjunto básico de organelas presentes na maioria das células animais. O núcleo, o retículo endoplasmático (RE), o aparelho de Golgi, os lisossomos, os endossomos, as mitocôndrias e os peroxissomos são compartimentos distintos separados do citosol *(cinza)* por pelo menos uma membrana seletivamente permeável. Os ribossomos estão também representados, embora não sejam envoltos por membranas e sejam muito pequenos para a visualização por microscopia óptica e, portanto, não se enquadram na definição original de uma organela. Alguns ribossomos são encontrados livres no citosol, e outros estão ligados à superfície citosólica do RE.

ORGANELAS ENVOLTAS POR MEMBRANAS

Enquanto uma célula procariótica consiste em um único compartimento, o **citosol**, que é envolvido pela membrana plasmática, as células eucarióticas são elaboradamente subdivididas por membranas internas. Essas membranas criam compartimentos fechados onde conjuntos de enzimas podem operar sem a interferência de reações que estão ocorrendo em outros compartimentos. Quando uma secção transversal por meio de uma célula vegetal ou animal é examinada por microscopia eletrônica, numerosos sacos definidos por membranas, tubos, esferas e estruturas de formato irregular podem ser visualizados, frequentemente arranjados sem muita ordem aparente (Figura 15-1). Essas estruturas são todas organelas distintas envoltas por membranas, ou partes de tais organelas, cada uma delas contendo um conjunto único de grandes e pequenas moléculas e desempenhando uma função especializada. Nesta seção, revisaremos essas funções e discutiremos como as diferentes organelas envoltas por membranas podem ter evoluído.

As células eucarióticas contêm um conjunto básico de organelas envoltas por membranas

As principais **organelas envoltas por membranas** de uma célula animal estão ilustradas na Figura 15-2, e suas funções estão resumidas na Tabela 15-1. Essas organelas são circundadas pelo citosol, o qual é envolto pela membrana plasmática. O *núcleo* é em geral a mais proeminente das organelas nas células

TABELA 15-1 As principais funções dos compartimentos envoltos por membranas de uma célula eucariótica

Compartimento	Principal função
Citosol	Contém muitas vias metabólicas (Capítulos 3 e 13); síntese de proteínas (Capítulo 7)
Núcleo	Contém o genoma principal (Capítulo 5); síntese de DNA e RNA (Capítulos 6 e 7)
Retículo endoplasmático (RE)	Síntese da maior parte dos lipídeos (Capítulo11); síntese de proteínas para Distribuição às várias organelas e à membrana plasmática (Capítulo 15)
Aparelho de Golgi	Modificação, distribuição e empacotamento de proteínas e lipídeos para as suas secreções ou entregas para outra organela (Capítulo 15)
Lisossomos	Degradação intracelular (Capítulo 15)
Endossomos	Distribuição de materiais endocitados (Capítulo 15)
Mitocôndrias	Síntese de ATP pela fosforilação oxidativa (Capítulo 14)
Cloroplastos (em células vegetais)	Síntese de ATP e fixação do carbono pela fotossíntese (Capítulo 14)
Peroxissomos	Oxidação de moléculas tóxicas

eucarióticas. Ele é circundado por uma dupla membrana conhecida por *envelope nuclear* e se comunica com o citosol pelos *poros nucleares* que perfuram o envelope. A membrana nuclear externa é contínua à membrana do *retículo endoplasmático (RE),* o qual é um sistema contínuo de sacos e tubos de membrana interconectados e que frequentemente se estende pela maior parte da célula. O RE é o principal sítio de síntese de novas membranas na célula. Grandes áreas do RE possuem ribossomos ligados à superfície citosólica, sendo consequentemente chamado de *retículo endoplasmático rugoso (RE rugoso).* Os ribossomos estão ativamente engajados na síntese de proteínas que são liberadas no lúmen do RE ou na membrana do RE. O *retículo endoplasmático liso (RE liso)* não possui ribossomos. É relativamente escasso na maioria das células, porém é altamente desenvolvido em outras para realizar funções particulares: por exemplo, ele é o sítio de síntese dos hormônios esteroides em células da glândula adrenal e o sítio onde uma variedade de moléculas orgânicas, incluindo o álcool, é detoxificada em células hepáticas. Em muitas células eucarióticas, o RE liso também sequestra Ca^{+} do citosol; a liberação e a recaptura de Ca^{+} do RE liso estão envolvidas na rápida resposta a muitos sinais extracelulares, como discutido nos Capítulos 12 e 16.

O *aparelho de Golgi,* situado normalmente próximo ao núcleo, recebe proteínas e lipídeos do RE, modifica-os e, então, despacha-os para outros destinos na célula. Pequenos sacos de enzimas digestórias denominados *lisossomos* degradam as organelas esgotadas, bem como macromoléculas e partículas captadas pela célula por endocitose. No seu caminho para os lisossomos, os materiais endocitados devem passar primeiro por uma série de compartimentos denominados *endossomos,* os quais distribuem algumas das moléculas ingeridas e as reciclam de volta para a membrana plasmática. Os **peroxissomos** são pequenas organelas envoltas por uma membrana simples. Eles contêm enzimas utilizadas em uma variedade de reações oxidativas que degradam lipídeos e destroem moléculas tóxicas. As *mitocôndrias* e os *cloroplastos* (nas células vegetais) são envoltos por uma dupla membrana e são os sítios de fosforilação oxidativa e fotossíntese, respectivamente (discutido no Capítulo 14); ambos contêm membranas bastante especializadas para a produção de ATP.

Muitas das organelas envoltas por membranas, incluindo o RE, o aparelho de Golgi, as mitocôndrias e os cloroplastos, são mantidas em seus locais relativos na célula por ligações ao citoesqueleto, especialmente aos microtúbulos. Os filamentos do citoesqueleto fornecem vias para o movimento das organelas e para o direcionamento do tráfego de vesículas entre elas. Esses movimentos são dirigidos por proteínas motoras que utilizam a energia da hidrólise do ATP para propulsionar as organelas e vesículas ao longo dos filamentos, como discutido no Capítulo 17.

TABELA 15-2 Os volumes relativos ocupados pelas principais organelas envoltas por membranas em uma célula do fígado (hepatócito)

Compartimento intracelular	Percentual do volume celular	Número aproximado por célula
Citosol	54	1
Mitocôndrias	22	1.700
Retículo endoplasmático	12	1
Núcleo	6	1
Aparelho de Golgi	3	1
Peroxissomos	1	400
Lisossomos	1	300
Endossomos	1	200

Em média, as organelas envoltas por membranas ocupam, juntas, aproximadamente metade do volume de uma célula eucariótica (Tabela 15-2), e a quantidade total de membranas associadas a elas é enorme. Em uma típica célula de mamíferos, por exemplo, a área da membrana do RE é de 20 a 30 vezes maior do que a da membrana plasmática. Em termos de sua área e massa, a membrana plasmática é somente uma membrana menor para a maior parte das células eucarióticas.

Pode-se aprender muito sobre a composição e a função de uma organela a partir do seu isolamento das outras estruturas celulares. Na sua maioria, as organelas são muito pequenas para serem isoladas manualmente, porém é possível separar um tipo de organela das outras por centrifugação diferencial (descrita no Painel 4-4, p. 164-165). Uma vez que uma amostra purificada de um tipo de organela tenha sido obtida, as proteínas das organelas podem ser identificadas. Em muitos casos, as próprias organelas podem ser incubadas em um tubo de ensaio sob condições que permitam o estudo de suas funções. Mitocôndrias isoladas, por exemplo, podem produzir ATP a partir da oxidação de piruvato em CO_2 e água, uma vez que sejam adequadamente supridas de ADP e O_2.

As organelas envoltas por membranas evoluíram de maneiras diferentes

Na tentativa de compreender as relações entre os diferentes compartimentos de uma célula eucariótica moderna, é de grande ajuda considerar a forma como eles devem ter evoluído. Os compartimentos provavelmente evoluíram em estágios. Acredita-se que os precursores das primeiras células eucarióticas tenham sido microrganismos simples, semelhantes a bactérias, com uma membrana plasmática e sem membranas internas. A membrana plasmática em tais células teria fornecido todas as funções dependentes de membranas, incluindo a síntese de ATP e a síntese de lipídeos, da mesma forma como realiza a membrana plasmática da maioria das modernas bactérias. As bactérias podem sobreviver dessa maneira em virtude do seu pequeno tamanho e da sua consequente razão superfície/volume alta. As suas membranas plasmáticas são suficientes para sustentar todas as funções vitais para as quais as membranas são necessárias. As células eucarióticas dos dias atuais, entretanto, possuem volumes de 1.000 a 10.000 vezes maiores do que uma bactéria típica, como *E. coli.* Uma célula desse tipo possui uma razão superfície/volume pequena e provavelmente não sobreviveria com uma membrana plasmática como única membrana. Portanto, o aumento de tamanho típico de células eucarióticas provavelmente não poderia ter ocorrido sem o desenvolvimento de membranas internas.

Acredita-se que as organelas envoltas por membranas se tenham originado de pelo menos duas formas na evolução. As membranas nucleares e as membranas do RE, do aparelho de Golgi, dos endossomos e dos lisossomos devem ter-se

Figura 15-3 As membranas nucleares e o RE podem ter evoluído pela invaginação da membrana plasmática. Em bactérias, a única molécula de DNA está tipicamente ligada à membrana plasmática. É possível que, em uma célula procariótica muito antiga, a membrana plasmática, que está ligada ao DNA, tenha invaginado e finalmente formado um envelope de duas camadas circundando completamente o DNA. Presume-se que esse envelope tenha se destacado totalmente da membrana plasmática, produzindo um compartimento nuclear circundado por uma membrana dupla. Esse envelope nuclear é penetrado por canais denominados poros nucleares, os quais permitem a direta comunicação com o citosol. Outras porções da mesma membrana formaram o RE, sobre o qual alguns dos ribossomos se ligaram. Esse esquema hipotético explicaria por que o espaço entre as membranas nucleares interna e externa é contínuo com o lúmen do RE.

originado de invaginações da membrana plasmática (**Figura 15-3**). Essas membranas e as organelas que elas recobrem são todas parte do que é coletivamente chamado de *sistema de endomembranas.* Como discutiremos mais tarde, os interiores dessas organelas (com a exceção do núcleo) se comunicam extensivamente uns com os outros e com o exterior da célula por meio de pequenas vesículas que brotam de uma das organelas e se fundem com as outras. Em concordância com essa proposta de origem evolucionária, os interiores dessas organelas são tratados pela célula de várias formas como "extracelulares", como veremos adiante. O esquema hipotético apresentado na Figura 15-3 também explicaria por que o núcleo é cercado por duas membranas. Embora invaginações de membrana sejam raras em bactérias atuais, elas ocorrem em algumas bactérias fotossintetizantes, nas quais regiões da membrana plasmática contendo a maquinaria fotossintetizante são internalizadas, formando vesículas intracelulares.

Acredita-se que as mitocôndrias e os cloroplastos se tenham originado de uma forma diferente. Eles diferem de todas as outras organelas por possuírem os seus próprios pequenos genomas e por poderem sintetizar parte de suas próprias proteínas, como discutido no Capítulo 14. A similaridade desses genomas com aqueles das bactérias e a perfeita semelhança de algumas proteínas com as de bactérias fortemente sugere que as mitocôndrias e os cloroplastos evoluíram a partir de bactérias que foram engolfadas por células eucarióticas primitivas com as quais elas inicialmente viveram em simbiose (**Figura 15-4**). Como seria esperado por suas origens, as mitocôndrias e os cloroplastos permanecem isolados do intenso tráfego vesicular que conecta os interiores da maioria das outras organelas envoltas por membranas umas com as outras e com o exterior da célula.

Tendo brevemente revisado as principais organelas envoltas por membranas das células eucarióticas, dedicaremo-nos à questão de como cada organela adquire seu conjunto particular de proteínas.

QUESTÃO 15-1

Como apresentado pelos desenhos da Figura 15-3, a bicamada lipídica das membranas nucleares interna e externa formam uma capa contínua, sendo juntadas ao redor dos poros nucleares. Como as membranas são líquidos bidimensionais, isso implicaria que as proteínas de membrana poderiam difundir-se livremente entre as duas membranas nucleares. No entanto, cada uma dessas duas membranas possui uma composição proteica diferente, refletindo funções diferentes. Como você conciliaria esse aparente paradoxo?

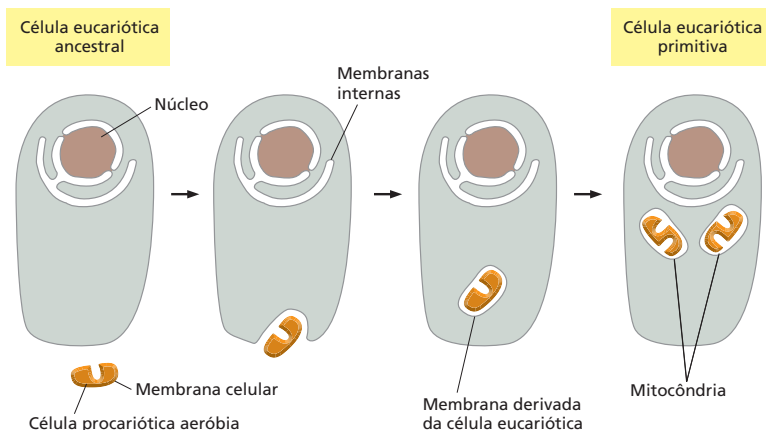



Figura 15-4 Acredita-se que as mitocôndrias se tenham originado quando um procarioto aeróbio foi engolfado por uma grande célula eucariótica anaeróbia. Acredita-se que os cloroplastos se tenham originado mais tarde de uma forma semelhante, quando uma célula eucariótica aeróbia engolfou um procarioto fotossintetizante. Essa teoria explicaria por que essas organelas possuem duas membranas e por que elas não participam do tráfego vesicular que conecta muitos outros compartimentos; também explicaria por que possuem seus próprios genomas.

DISTRIBUIÇÃO DE PROTEÍNAS

Antes que uma célula eucariótica se reproduza ao dividir-se em duas, ela tem de duplicar as suas organelas envoltas por membranas. Uma célula não pode produzir essas organelas a partir do zero: ela necessita de informações das próprias organelas. Assim, a maior parte das organelas é formada a partir de organelas preexistentes, que crescem e então se dividem. À medida que as células crescem, as organelas envoltas por membranas são alargadas pela incorporação de novas moléculas; as organelas então se dividem e, na divisão celular, distribuem-se entre as duas células-filhas. O crescimento das organelas requer um suprimento de novos lipídeos para produzir mais membranas e um fornecimento das proteínas apropriadas – tanto proteínas de membrana como proteínas solúveis que ocuparão o interior da organela. Mesmo em células que não estão em divisão, as proteínas são produzidas continuamente. Essas proteínas recém-sintetizadas devem ser entregues às organelas de forma precisa – algumas para a eventual secreção pela célula e outras para substituir as proteínas de organelas que foram degradadas. O direcionamento de novas proteínas sintetizadas para as organelas corretas é, portanto, necessário para a célula ser capaz de crescer, dividir e funcionar de maneira apropriada.

Para algumas organelas, incluindo as mitocôndrias, os cloroplastos e o interior do núcleo, as proteínas são entregues diretamente a partir do citosol. Para outras, incluindo o aparelho de Golgi, os lisossomos, os endossomos e as membranas nucleares, as proteínas e os lipídeos são entregues indiretamente pelo RE, o qual é, ele próprio, o sítio principal de síntese de proteínas e lipídeos. As proteínas entram no RE diretamente a partir do citosol: algumas são lá retidas, porém a maioria é transportada por vesículas ao aparelho de Golgi e então adiante para outras organelas ou para a membrana plasmática.

Nesta seção, discutiremos os mecanismos pelos quais as proteínas diretamente entram nas organelas envoltas por membranas a partir do citosol. As proteínas produzidas no citosol são despachadas para diferentes locais na célula de acordo com marcas específicas de endereços que elas contêm nas suas sequências de aminoácidos. Uma vez no endereço correto, as proteínas entram nas organelas.

As proteínas são importadas pelas organelas por três mecanismos

A síntese de praticamente todas as proteínas da célula se inicia nos ribossomos no citosol. As exceções são algumas proteínas de mitocôndrias e cloroplastos que são sintetizados por ribossomos dentro dessas organelas. A maior parte das proteínas mitocondriais e cloroplásticas, entretanto, é feita no citosol e, subsequentemente, importada. O destino de uma molécula proteica sintetizada no citosol depende de sua sequência de aminoácidos, a qual pode conter um *sinal de distribuição* que direciona a proteína para a organela onde é requerida. As proteínas que não possuem esses sinais permanecem residentes no citosol; aquelas que possuem um sinal de distribuição se movem do citosol para a organela apropriada. Diferentes sinais de distribuição direcionam as proteínas para o núcleo, mitocôndrias, cloroplastos (em plantas), peroxissomos e para o RE.

Quando uma organela envolta por membranas importa uma proteína do citosol ou de outra organela, ela enfrenta um problema: como ela pode fazer a proteína atravessar a membrana que é normalmente impermeável a macromoléculas hidrofílicas? Essa tarefa é realizada de maneiras diferentes por diferentes organelas.

1. As proteínas que se movem do citosol para o núcleo são transportadas pelos poros nucleares que transpassam as membranas nucleares externa e interna. Esses poros funcionam como portões seletivos que transportam ativamente macromoléculas específicas, mas também permitem a difusão livre de moléculas menores (mecanismo 1 na **Figura 15-5**).

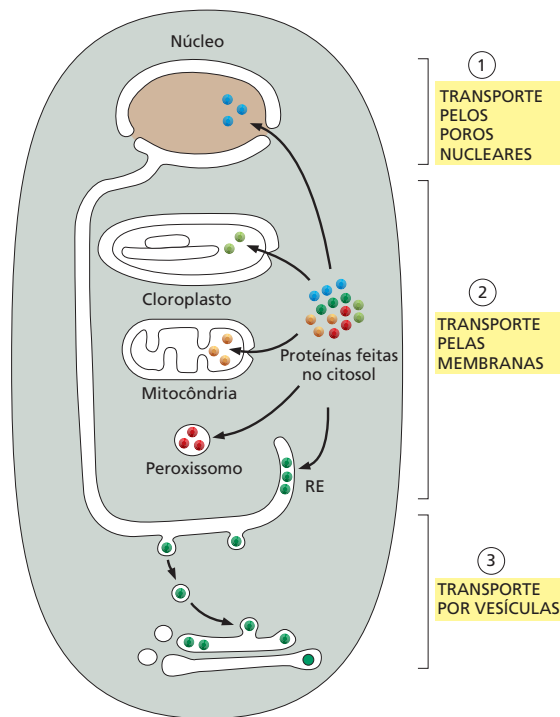



Figura 15-5 As organelas envoltas por membranas importam proteínas por um de três mecanismos. Todos esses processos requerem energia. As proteínas permanecem enoveladas durante as etapas de transporte dos mecanismos 1 e 3, mas normalmente devem desenovelar-se no mecanismo 2.

2. As proteínas que se movem do citosol para o RE, mitocôndrias ou cloroplastos são transportadas pelas membranas das organelas por *translocadores proteicos* localizados nas membranas. Diferentemente do transporte por poros nucleares, a molécula proteica transportada normalmente deve desdobrar-se de forma a serpentear pela membrana (mecanismo 2 na Figura 15-5). As bactérias possuem translocadores proteicos semelhantes nas suas membranas plasmáticas, que elas utilizam para exportar proteínas a partir do seu citosol.
3. As proteínas que se movem do RE adiante ou de um compartimento do sistema de endomembranas para outro são transportadas por um mecanismo fundamentalmente diferente dos dois anteriores. Essas proteínas são conduzidas por *vesículas de transporte,* as quais se tornam cheias de uma carga de proteínas do espaço interior, ou *lúmen,* de um compartimento, à medida que se desprendem das suas membranas. As vesículas subsequentemente descarregam a sua carga em um segundo compartimento ao fusionar-se com a membrana deste (mecanismo 3 na Figura 15-5). No processo, lipídeos de membrana e proteínas de membrana são também entregues de um primeiro compartimento para um segundo.

As sequências-sinal direcionam as proteínas para os compartimentos corretos

O sinal de distribuição típico em proteínas é uma porção da sequência de aminoácidos, tipicamente com 15 a 60 aminoácidos de comprimento. Essa **sequência-sinal** é frequentemente (mas não sempre) removida da proteína acabada, uma vez que a decisão de distribuição tenha sido executada. Algumas das sequências-sinal utilizadas para especificar os diferentes destinos na célula estão apresentadas na Tabela 15-3.

As sequências-sinal são, por si só, necessárias e suficientes para direcionar uma proteína para uma determinada organela. Isso foi demonstrado por experimentos nos quais as sequências foram removidas ou transferidas de uma proteína para outra por técnicas de engenharia genética (discutidas no Capítulo

TABELA 15-3 Algumas sequências-sinal típicas

Função do sinal	Exemplo de sequência-sinal
Importação para RE	$^{+}H_3N$-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln
Retenção no lúmen do RE	–Lys-Asp-Glu-Leu-COO^{-}
Importação para mitocôndrias	$^{+}H_3N$-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
Importação para o núcleo	–Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Importação para peroxissomos	-Ser-Lys-Leu

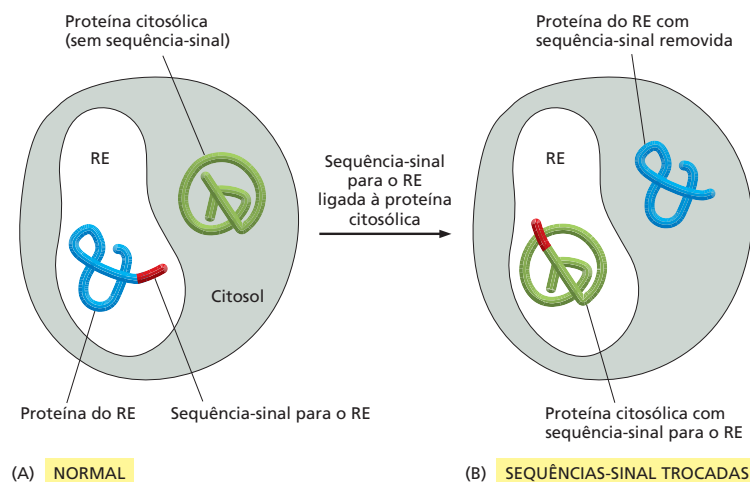
Os aminoácidos positivamente carregados estão apresentados em *vermelho*, e os aminoácidos negativamente carregados, em *azul*. Um extenso bloco de aminoácidos hidrofóbicos está representado em *verde*. $^{+}H_3N$ indica a terminação amino de uma proteína; COO^{-} indica o C-terminal. O sinal de retenção do RE é referido, habitualmente, pela sua abreviação de uma letra, KDEL.

10). A remoção de uma sequência-sinal de uma proteína do RE, por exemplo, a converte em uma proteína citosólica, e a introdução de uma sequência-sinal de RE no início de uma proteína citosólica redireciona a proteína para o RE (**Figura 15-6**). As sequências-sinal que especificam um mesmo destino podem variar, ainda que possuam a mesma função: propriedades físicas, como a hidrofobicidade ou a colocação de aminoácidos carregados, parecem frequentemente ser mais importantes para a função desses sinais do que a exata sequência dos aminoácidos.

As proteínas entram no núcleo pelos poros nucleares

O **envelope nuclear** encerra o DNA nuclear e define o compartimento nuclear. Ele é formado de duas membranas concêntricas. A membrana nuclear interna contém proteínas que atuam como sítios de ligação para os cromossomos (discutido no Capítulo 5) e fornecem sustentação para a *lâmina nuclear,* uma malha tecida de filamentos proteicos que se dispõe sobre a face interna dessa membrana e que fornece um suporte estrutural para o envelope nuclear (discutido no Capítulo 17). A composição da membrana nuclear externa se assemelha muito à membrana do RE, com a qual ela é contínua (**Figura 15-7**).

Em todas as células eucarióticas, o envelope nuclear é perfurado por **poros nucleares**, os quais formam canais por onde todas as moléculas entram ou saem do núcleo. O tráfego ocorre pelos poros em ambas as direções: protei-

Figura 15-6 **As sequências-sinal direcionam as proteínas às organelas corretas.** (A) As proteínas destinadas ao RE possuem uma sequência-sinal N-terminal que as direciona para aquela organela, ao passo que aquelas destinadas a permanecer no citosol não possuem essa sequência. (B) Técnicas de DNA recombinante podem ser utilizadas para trocar a localização de duas proteínas: se a sequência-sinal é removida da proteína do RE e anexada à proteína citosólica, as proteínas acabam se localizando em um local anormal na célula. Tais experimentos indicam que a sequência-sinal do RE é tanto necessária como suficiente para direcionar a proteína para o RE.

nas recém-sintetizadas provenientes do citosol e destinadas ao núcleo entram (**Animação 15.1**); moléculas de RNA, sintetizadas no núcleo, e subunidades ribossomais, montadas no núcleo, são exportadas. As moléculas de RNA mensageiro processadas de forma incompleta não são exportadas do núcleo, indicando que o transporte nuclear serve como uma etapa final de controle de qualidade da síntese e do processamento de mRNA (discutido no Capítulo 7).

Um poro nuclear é uma estrutura grande e elaborada composta de cerca de 30 proteínas diferentes (**Figura 15-8**). Cada poro contém canais cheios de água por meio dos quais pequenas moléculas solúveis em água podem passar livres e não seletivamente entre o núcleo e o citosol. Muitas das proteínas que revestem o poro nuclear contêm regiões extensivas sem estrutura, as quais se acredita que formem uma trança desordenada – semelhante a uma cama de algas no oceano. Esse emaranhado preenche o centro do canal, prevenindo a passagem de grandes moléculas, mas permitindo que pequenas moléculas deslizem por ele.

Moléculas maiores (como RNAs e proteínas) e complexos macromoleculares devem carregar um sinal de distribuição apropriado para passar pelo poro nuclear. A sequência-sinal que direciona uma proteína do citosol para o núcleo, chamada de *sinal de localização nuclear,* consiste tipicamente em uma ou duas sequências curtas contendo várias lisinas ou argininas carregadas positivamente (ver Tabela 15-3).

As proteínas citosólicas, chamadas de *receptores de transporte nuclear,* ligam-se ao sinal de localização nuclear nas proteínas recém-sintetizadas destinadas ao núcleo. Esses receptores ajudam a direcionar a nova proteína ao poro nuclear por interações com fibrilas semelhantes a tentáculos que se estendem da borda do poro (**Figura 15-9**). Durante o transporte, os receptores de transporte nuclear se prendem sobre sequências repetidas de aminoácidos dentro do emaranhado de proteínas do poro nuclear, puxando-se de uma para outra

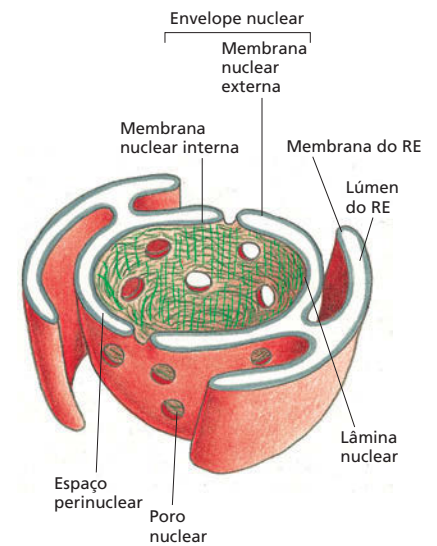
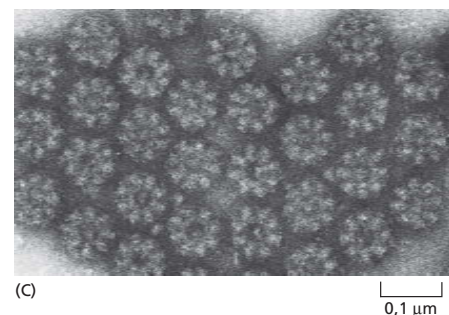
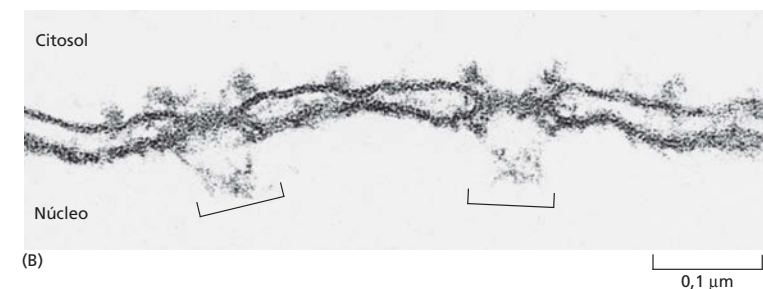
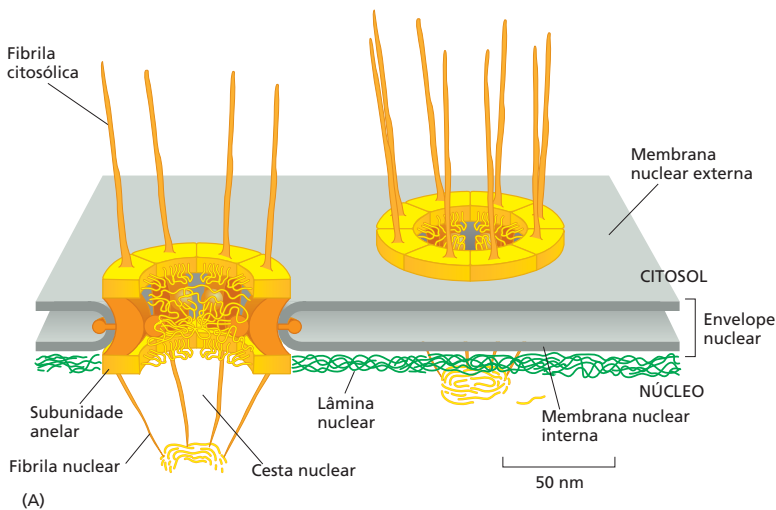
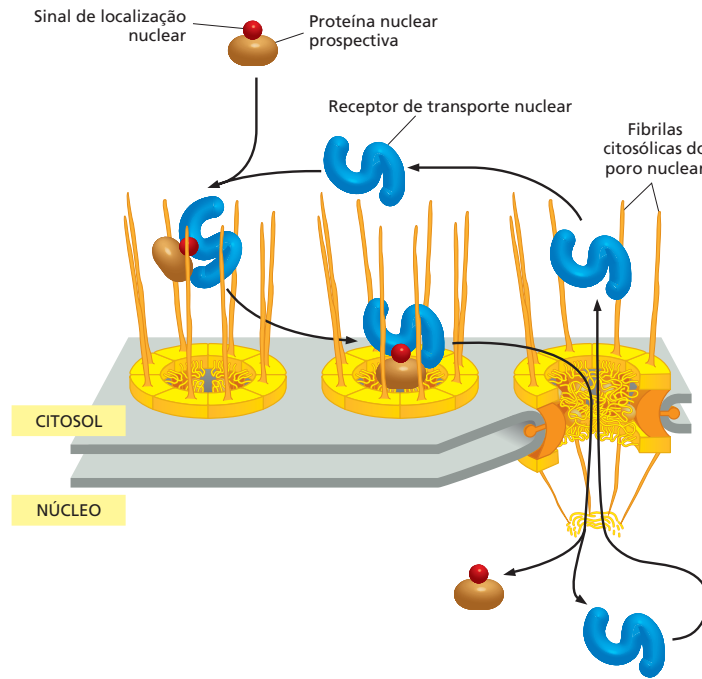
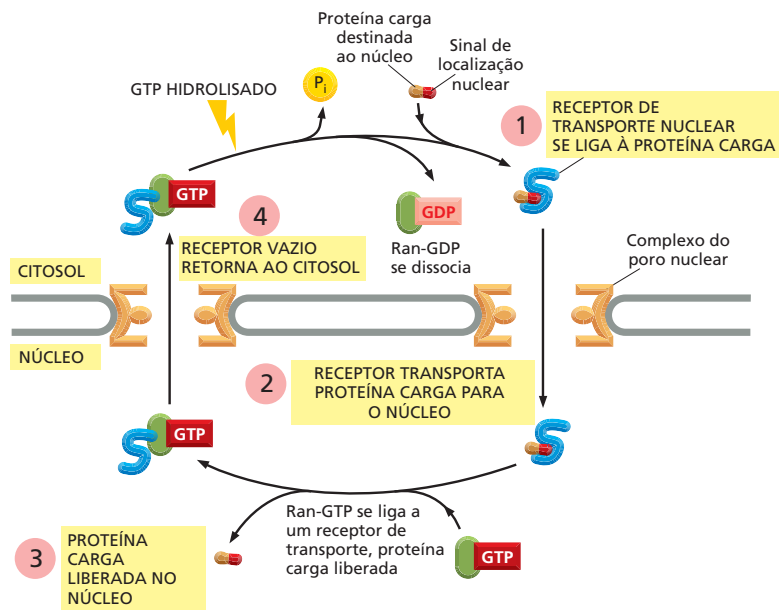



Figura 15-7 A membrana nuclear externa é contínua ao RE. A membrana dupla do envelope nuclear é perfurada por poros nucleares. Os ribossomos que estão normalmente ligados à superfície citosólica da membrana do RE e à membrana nuclear externa não estão representados.

Figura 15-8 O complexo dos poros nucleares forma um portão por meio do qual as moléculas entram ou saem do núcleo. (A) Desenho de uma pequena região do envelope nuclear demonstrando dois complexos de poros. Cada complexo é composto por um grande número de subunidades proteicas distintas. Fibrilas proteicas se lançam para ambos os lados do complexo; na face nuclear, elas convergem para formar uma estrutura semelhante a cestas. O espaçamento entre as fibrilas é largo o suficiente para não obstruir o acesso aos poros. (B) Microfotografia eletrônica de uma região do envelope nuclear demonstrando a visão lateral de dois complexos de poros nucleares (*colchetes*). (C) Microfotografia eletrônica demonstrando uma visão frontal dos complexos de poros nucleares; as membranas foram extraídas com detergente. (B, cortesia de Werner W. Franke; C, cortesia de Ron Milligan.)

Figura 15-9 Proteínas destinadas ao núcleo são ativamente transportadas pelos poros nucleares. A proteína nuclear, com seu receptor ligado, é transportada ativamente para dentro do núcleo. Para maior clareza, a estrutura de fibrilas em forma de cesta que se estende para dentro do núcleo (ver Figura 15-8) não está mostrada. Um tipo similar de receptor de transporte, operando na direção reversa, exporta mRNAs do núcleo (ver Figura 7-20); os dois grupos de receptores têm uma estrutura básica semelhante. Uma secção de um complexo de poro nuclear mostra como as regiões não estruturadas das proteínas que revestem o poro central formam um emaranhado que bloqueia a difusão passiva de macromoléculas grandes para dentro e para fora do núcleo.

para transportar sua carga de proteína para dentro do núcleo. Uma vez que a proteína foi transportada, o receptor de transporte nuclear retorna ao citosol pelo poro nuclear para ser reutilizado (ver Figura 15-9). Como qualquer processo que requer ordem, a importação de proteínas para dentro do núcleo requer energia. Nesse caso, a energia é fornecida pela hidrólise de GTP, que direciona o transporte nuclear na direção apropriada (**Figura 15-10**). As proteínas do poro nuclear operam esse portão molecular a uma velocidade incrível, bombeando macromoléculas em ambas as direções através de cada poro.

Os poros nucleares transportam proteínas nas suas conformações nativas, completamente enoveladas, e transferem componentes ribossomais como partículas montadas. Essa característica distingue o mecanismo de transporte nuclear

Figura 15-10 A energia fornecida pela hidrólise de GTP direciona o transporte nuclear. Um receptor de transporte nuclear capta sua proteína carga no citosol e entra no núcleo. Lá ele encontra uma pequena proteína denominada Ran, que carrega uma molécula de GTP. Essa Ran-GTP se liga ao receptor de transporte nuclear fazendo com que libere sua carga. Tendo liberado sua carga no núcleo, o receptor nuclear – ainda carregando Ran-GTP – é transportado de volta ao citosol pelo poro. Lá uma proteína acessória (não mostrada) aciona Ran para hidrolisar seu GTP ligado. Ran-GDP sai do receptor de transporte, que então está livre para ligar outra proteína destinada ao núcleo. Um ciclo semelhante opera para exportar mRNAs e outras moléculas grandes do núcleo para o citosol.

dos mecanismos que transportam proteínas para dentro de outras organelas. As proteínas devem desenovelar-se durante os seus transportes pelas membranas de outras organelas, como mitocôndrias, cloroplastos e RE, como discutido a seguir.

As proteínas se desenovelam para entrar em mitocôndrias e cloroplastos

Tanto as mitocôndrias quanto os cloroplastos são circundados por membranas internas e externas, e ambas as organelas são especializadas na síntese de ATP. Os cloroplastos também contêm um terceiro sistema de membranas, a membrana tilacoide (discutido no Capítulo 14). Embora ambas as organelas contenham os seus próprios genomas e produzam parte de suas próprias proteínas, a maior parte das proteínas mitocondriais e cloroplásticas é codificada por genes do núcleo e são importadas a partir do citosol. Essas proteínas normalmente possuem uma sequência-sinal na região N-terminal que as permite entrar na sua organela específica. Proteínas destinadas a essas organelas são translocadas simultaneamente através de ambas as membranas, externa e interna, em sítios especializados onde as duas membranas estão em contato uma com a outra. Cada proteína é desenovelada à medida que é transportada, e sua sequência-sinal é removida após a translocação ser completada (**Figura 15-11**). As proteínas chaperonas (discutidas no Capítulo 4), dentro das organelas, ajudam a puxar as proteínas pelas duas membranas e a restituir as suas conformações, uma vez que essas estejam internalizadas. O transporte subsequente a um determinado sítio dentro da organela, como a membrana interna ou externa ou a membrana tilacoide nos cloroplastos, normalmente requer outras sequências-sinal na proteína, as quais são em geral expostas somente após a remoção da primeira sequência-sinal. A inserção de proteínas transmembrana na membrana interna, por exemplo, é guiada por sequências-sinal na proteína que iniciam e param o processo de transferência pela membrana, como descreveremos mais adiante para a inserção de proteínas transmembrana na membrana do RE.

O crescimento e a manutenção das mitocôndrias e dos cloroplastos não requerem somente a importação de novas proteínas, mas também de novos lipídeos para as suas membranas. Acredita-se que a maior parte dos seus fosfolipídeos de membrana sejam importados do RE, o qual é o sítio principal de síntese de lipídeos na célula. Os fosfolipídeos são transportados individualmente para essas organelas por proteínas hidrossolúveis carreadoras de lipídeos que extraem uma molécula fosfolipídica de uma membrana e a entregam à outra. Essas proteínas asseguram que as diferentes membranas celulares sejam capazes de manter sua composição lipídica característica.

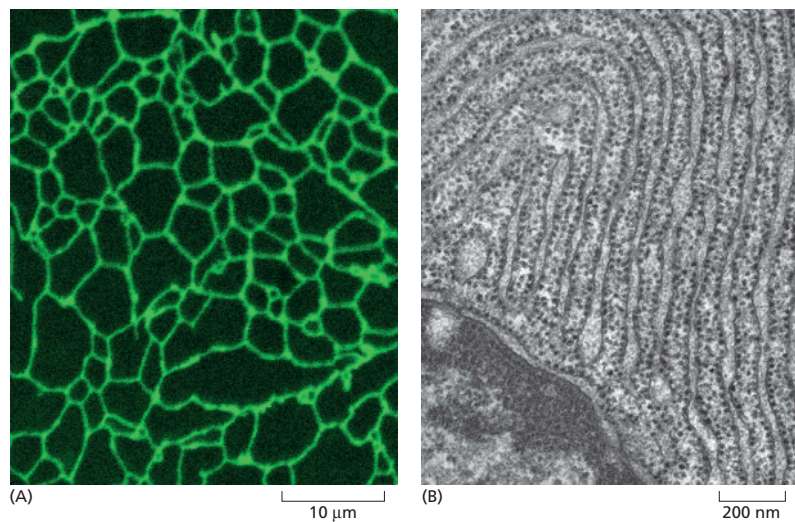
QUESTÃO 15-2

Por que as células eucarióticas necessitam de um núcleo na forma de um compartimento separado, ao passo que as células procarióticas podem funcionar perfeitamente sem tal organela?

As proteínas entram no retículo endoplasmático enquanto são sintetizadas

O **retículo endoplasmático** (**RE**) é o mais extenso sistema de membranas em uma célula eucariótica (**Figura 15-12A**). Diferente das organelas discutidas até

Figura 15-11 Proteínas são importadas para dentro das mitocôndrias em uma forma desenovelada. A sequência-sinal mitocondrial é reconhecida por um receptor da membrana mitocondrial externa. O complexo formado pelo receptor e pela proteína ligada se difunde lateralmente na membrana até um sítio de contato, onde a proteína é translocada pelas membranas externa e interna por um translocador de proteína (**Animação 15.2**). A sequência-sinal é clivada por uma peptidase de sinal dentro da organela. As proteínas são importadas para dentro dos cloroplastos por um mecanismo similar. As proteínas chaperonas que auxiliam a puxar as proteínas pelas membranas e as ajudam a se reenovelar não estão representadas.

Figura 15-12 O retículo endoplasmático é a mais extensa rede de membranas das células eucarióticas. (A) Microfotografia de fluorescência de uma célula vegetal viva demonstrando o RE como uma complexa rede de tubos. As células mostradas aqui foram geneticamente modificadas de forma a conter uma proteína fluorescente no seu RE. Apenas uma parte da rede do RE em uma célula é mostrada. (B) Uma microfotografia eletrônica apresentando o RE rugoso em uma célula de pâncreas canino que produz e secreta grandes quantidades de enzimas digestórias. O citosol está preenchido com camadas firmemente empacotadas de RE, repleto de ribossomos. No canto inferior à esquerda, está uma porção do núcleo e seu envelope nuclear; note que a membrana nuclear externa, que é contínua ao RE, também está repleta de ribossomos. Para uma visão dinâmica da rede do RE, observe a **Animação 15.3** (A, cortesia de Jim Haseloff; B, cortesia de Lelio Orci.)

agora, ele serve como ponto de entrada para proteínas destinadas para outras organelas, bem como de proteínas para o próprio RE. As proteínas destinadas ao aparelho de Golgi, aos endossomos e lisossomos, assim como as proteínas destinadas à superfície celular, entram primeiro no RE provenientes do citosol. Uma vez dentro do RE ou na membrana do RE, as proteínas individuais não retornarão ao citosol durante as suas jornadas adiante. Elas serão carregadas de uma organela para outra por vesículas de transporte e, em alguns casos, de uma organela para a membrana plasmática ou para o exterior celular.

Dois tipos de proteínas são transferidos do citosol para o RE: (1) as proteínas hidrossolúveis são completamente translocadas pela membrana do RE e liberadas no lúmen do RE; (2) as proteínas transmembrana prospectivas são apenas parcialmente translocadas pela membrana do RE e se tornam embebidas nela. As proteínas hidrossolúveis se destinam à secreção (para liberação na superfície celular) ou para o lúmen de uma organela; as proteínas transmembrana têm como destino residir na membrana do RE, na membrana de outra organela, ou na membrana plasmática. Todas essas proteínas são inicialmente direcionadas ao RE por uma *sequência-sinal de RE,* um segmento de oito ou mais aminoácidos hidrofóbicos (ver Tabela 15-3, p. 502), o qual está também envolvido no processo de translocação através da membrana.

Diferentemente das proteínas que entram no núcleo, nas mitocôndrias, nos cloroplastos e nos peroxissomos, a maior parte das proteínas que entram no RE iniciam a sua rota por meio da membrana do RE antes que a cadeia polipeptídica esteja completamente sintetizada. Isso exige que os ribossomos que estejam sintetizando as proteínas fiquem presos à membrana do RE. Esses ribossomos ligados à membrana do RE cobrem a superfície do RE, criando regiões chamadas de **retículo endoplasmático rugoso**, em virtude da sua aparência granulosa característica quando visualizado em um microscópio eletrônico (Figura 15-12B).

Há, entretanto, duas populações separadas de ribossomos no citosol. Os *ribossomos ligados à membrana* estão presos à face citosólica da membrana do RE (e da membrana nuclear externa) e estão produzindo proteínas que serão translocadas ao RE. Os *ribossomos livres* não estão presos a qualquer membrana e sintetizam todas as demais proteínas codificadas pelo DNA nuclear. Os ribossomos ligados a membranas e os ribossomos livres são estrutural e funcionalmente idênticos; eles diferem unicamente pelas proteínas que estão sintetizando em um determinado momento. Quando ocorre de um ribossomo estar sintetizando uma proteína com um sinal para RE, a sequência-sinal direciona o ribossomo à membrana do RE. À medida que uma molécula de mRNA é traduzida, muitos ribossomos se ligam a ela, formando um *polirribossomo* (discutido

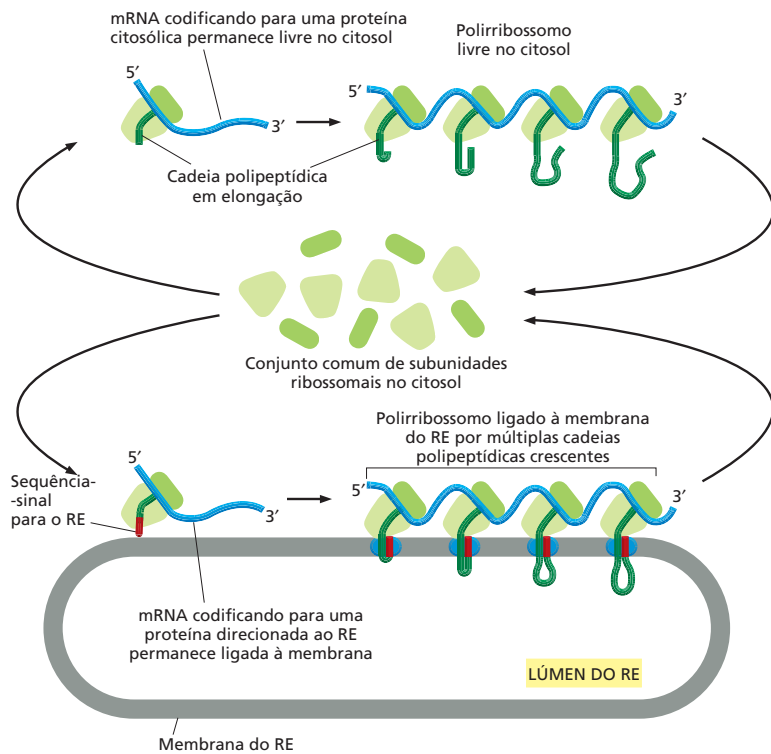



Figura 15-13 Um conjunto comum de ribossomos é utilizado para sintetizar tanto as proteínas que permanecerão no citosol quanto aquelas que serão transportadas para organelas envoltas por membranas, incluindo o RE. Ribossomos que estão traduzindo proteínas citosólicas permanecem livres no citosol. Para proteínas que são destinadas ao RE, uma sequência-sinal *(vermelho)* na cadeia polipeptídica crescente direciona o ribossomo para a membrana do RE. Muitos ribossomos se ligam a cada molécula de mRNA, formando um polirribossomo. Ao final de cada ciclo de síntese da proteína, as subunidades ribossomais são liberadas e se reúnem ao grupo comum no citosol.

no Capítulo 7). No caso de uma molécula de mRNA codificante de uma proteína com uma sequência-sinal de RE, o polirribossomo se torna rebitado à membrana do RE pela cadeia crescente do polipeptídeo, a qual é inserida na membrana (**Figura 15-13**).

QUESTÃO 15-3

Explique como uma molécula de mRNA pode permanecer ligada à membrana do RE enquanto os ribossomos individuais que a traduzem são liberados e se reúnem ao conjunto citosólico de ribossomos depois de cada ciclo de tradução.

As proteínas solúveis são liberadas no lúmen do RE

A sequência-sinal para RE é guiada para a membrana do RE por pelo menos dois componentes proteicos: (1) uma *partícula de reconhecimento de sinal* (*SRP*) que está presente no citosol e se liga à sequência-sinal de RE quando exposta pelo ribossomo, e (2) um *receptor de SRP* que está embebido na membrana do RE, que reconhece SRP. A ligação de uma SRP à sequência-sinal determina um atraso da síntese proteica pelo ribossomo, até que ele e a sua SRP se liguem ao receptor de SRP. Após ligar-se ao seu receptor, a SRP é liberada e a síntese proteica recomeça, com a cadeia polipeptídica sendo agora dirigida para o lúmen do RE por um *canal de translocação* da membrana do RE (**Figura 15-14**). Portanto, a SRP e o receptor da SRP funcionam como sítios moleculares de posicionamento, conectando os ribossomos que estão sintetizando proteínas que contêm uma sequência-sinal de RE para os canais de translocação do RE disponíveis.

Figura 15-14 Uma sequência-sinal de RE e uma SRP direcionam o ribossomo para a membrana do RE. A SRP se liga à sequência-sinal de RE exposta e ao ribossomo, atrasando a síntese proteica pelo ribossomo. O complexo ribossomo-SRP então se liga ao receptor da SRP na membrana do RE. A SRP é liberada a seguir, passando o ribossomo a um canal de translocação na membrana do RE. Finalmente, o canal de translocação insere a cadeia polipeptídica através da membrana e inicia a transferência pela bicamada lipídica.

Além de direcionar as proteínas ao RE, a sequência-sinal, que em proteínas solúveis está quase sempre na região N-terminal da proteína, tem a função de abrir o canal de translocação. O peptídeo-sinal permanece ligado ao canal, ao passo que o restante da cadeia proteica é introduzido pela membrana como uma grande alça. Em algum momento durante a translocação, a sequência-sinal é clivada por uma peptidase de sinal localizada na face luminal da membrana do RE; o peptídeo-sinal é então liberado do canal de translocação e rapidamente degradado. Uma vez que o C-terminal da proteína passou pela membrana, a proteína é liberada dentro do lúmen do RE (**Figura 15-15**).

Sinais de início e de parada determinam o arranjo de uma proteína transmembrana na bicamada lipídica

Nem todas as proteínas que entram no RE são liberadas no lúmen do RE. Algumas permanecem embebidas na membrana do RE, como as proteínas transmembrana. O processo de translocação para tais proteínas é mais complicado do que o processo para as proteínas solúveis, uma vez que algumas partes da cadeia polipeptídica devem ser translocadas pela bicamada lipídica, ao passo que outras permanecem fixas na membrana.

No caso mais simples, aquele da proteína transmembrana com um único segmento distribuído na membrana, a sequência-sinal N-terminal inicia a translocação, da mesma forma que o faz para uma proteína solúvel. No entanto, o processo de translocação é interrompido por uma sequência adicional de aminoácidos hidrofóbicos, uma *sequência de parada de transferência,* mais adiante na cadeia polipeptídica (**Figura 15-16**). Essa segunda sequência é liberada do canal de translocação e se direciona para o plano da bicamada lipídica, onde forma um segmento α-helicoidal de distribuição na membrana, que ancora a proteína na membrana. Simultaneamente, a sequência-sinal N-terminal também é liberada do canal na bicamada lipídica e clivada. Como resultado, a proteína translocada termina como proteína transmembrana inserida na membrana em uma orientação definida – o N-terminal na face luminal da bicamada lipídica e o C-terminal na face citosólica (ver Figura 15-16). Como discutido no Capítulo 11, uma vez inserida na membrana, a proteína transmembrana não modifica a sua orientação, a qual é retida pelos eventos subsequentes de brotamento e fusão vesicular.

Em algumas proteínas transmembrana, uma sequência interna, em vez de uma N-terminal, é utilizada para iniciar a transferência da proteína; essa sequência-sinal interna, chamada de *sequência de início de transferência,* nunca é removida do polipeptídeo. Esse arranjo ocorre em algumas proteínas transmembrana nas quais a cadeia polipeptídica passa várias vezes pela bicamada lipídica. Nesses casos, acredita-se que as sequências-sinal hidrofóbicas trabalham aos pares: uma

Figura 15-15 Uma proteína solúvel atravessa a membrana do RE e entra no lúmen. Um canal de translocação de proteínas se liga à sequência-sinal e transfere ativamente o restante do polipeptídeo pela bicamada lipídica como uma alça. Em um dado momento, durante o processo de translocação, o peptídeo-sinal é clivado da proteína crescente por uma peptidase-sinal. Essa sequência-sinal clivada é ejetada para dentro da bicamada, onde ela é degradada e o polipeptídeo translocado é liberado como uma proteína solúvel no lúmen do RE. Uma vez que a proteína foi liberada, o poro do canal de translocação se fecha. O ribossomo ligado à membrana está omitido nesta e nas próximas duas figuras para maior clareza.

Figura 15-16 **Uma proteína transmembrana de passagem única é integrada na membrana do RE.** Uma sequência-sinal de RE N-terminal *(em vermelho)* inicia a transferência como apresentado na Figura 15-15. Adicionalmente, a proteína também possui uma segunda sequência hidrofóbica, uma sequência de finalização de transferência *(em laranja)*. Quando essa sequência entra no canal de translocação, o canal descarrega a proteína lateralmente para a bicamada lipídica. A sequência-sinal N-terminal é clivada fora, deixando a proteína transmembrana ancorada na membrana (**Animação 15.4**). A síntese de proteínas na face citosólica continua até completar-se.

sequência interna de início de transferência serve para iniciar a translocação, que continua até que uma sequência de parada de transferência seja alcançada; as duas sequências α-helicoidais hidrofóbicas são então liberadas na bicamada, onde permanecem como α-hélices que atravessam a membrana (**Figura 15-17**). Em proteínas de multipassagem complexas, nas quais várias α-hélices hidrofóbicas se distribuem pela bicamada, outros pares de sequências de início e de parada entram em ação: uma sequência reinicia a translocação mais adiante na cadeia polipeptídica e uma outra termina a translocação e determina a liberação do polipeptídeo, e assim por diante para inícios e paradas subsequentes. Portanto, proteínas de multipassagem pela membrana são costuradas na bicamada lipídica à medida que são sintetizadas por um mecanismo semelhante aos trabalhos de máquinas de costura.

Tendo considerado como as proteínas entram no lúmen do RE ou se tornam embebidas na membrana do RE, discutiremos agora como elas são carregadas adiante pelo transporte vesicular.

QUESTÃO 15-4

A. Prediga a orientação na membrana de uma proteína que é sintetizada com uma sequência-sinal interna, não clivada (apresentada como a sequência de início de transferência *vermelha* na Figura 15-17), mas que não contém um peptídeo de parada de transferência.
B. Semelhantemente, prediga a orientação de membrana de uma proteína que é sintetizada com uma sequência N-terminal clivada seguida de uma sequência de parada de transferência, acompanhada por uma sequência de início de transferência.
C. Que arranjo de sequências-sinal permitiria a inserção de uma proteína de multipassagem com um número ímpar de segmentos transmembrana?

Figura 15-17 **Uma proteína transmembrana de passagem dupla usa uma sequência de início de transferência interna para integrar-se na membrana do RE.** Uma sequência-sinal de RE interna *(em vermelho)* atua como sinal de início de transferência da cadeia polipeptídica. Como uma sequência-sinal de RE N-terminal, o sinal interno de início de transferência é reconhecido por uma SRP que traz o ribossomo à membrana do RE (não mostrado). Quando uma sequência de parada de transferência *(em laranja)* entra no canal de translocação, esse descarrega ambas as sequências lateralmente para a bicamada lipídica. Nem a sequência de início nem a de parada da transferência são clivadas, e a cadeia polipeptídica inteira permanece ancorada na membrana como uma proteína transmembrana de passagem dupla. As proteínas que se distribuem mais vezes pela membrana contêm outros pares de sequências de início e de parada, e o mesmo processo é repetido para cada par.

TRANSPORTE VESICULAR

Normalmente, a entrada no RE é somente a primeira etapa de uma rota para outro destino. Tal destino, pelo menos inicialmente, é o aparelho de Golgi. O transporte do RE para o aparelho de Golgi, e a partir do aparelho de Golgi para outros compartimentos do sistema de endomembranas, é conduzido pelo contínuo brotamento e pela fusão de **vesículas de transporte**. As rotas de transporte mediadas pelas vesículas se estendem para fora do RE em direção à membrana plasmática e para dentro da membrana plasmática para os lisossomos, fornecendo, portanto, rotas de comunicação entre o interior da célula com suas vizinhanças. À medida que proteínas e lipídeos são transportados para fora por essas rotas, muitos deles sofrem vários tipos de modificações químicas, como a adição de cadeias laterais de carboidratos (tanto em proteínas como em lipídeos) e a formação de pontes dissulfídicas (em proteínas) que estabilizam a estrutura proteica.

Nesta seção, discutiremos como as vesículas transportam proteínas e membranas entre os compartimentos celulares, permitindo às células comer e secretar. Também consideraremos como essas vesículas de transporte são direcionadas ao seu destino próprio, seja esse o RE, o aparelho de Golgi, a membrana plasmática ou algum outro compartimento envolto por membranas.

As vesículas de transporte carregam proteínas solúveis e membranas entre compartimentos

O transporte vesicular entre compartimentos envoltos por membranas do sistema de endomembranas é altamente organizado. Uma *via secretória* principal, para fora, inicia com a síntese de proteínas sobre a membrana do RE e sua entrada no RE, e conduz pelo aparelho de Golgi até a superfície celular; no aparelho de Golgi, uma rota lateral conduz o transporte através dos endossomos até os lisossomos (**Figura 15-18**). Um *via endocítica* principal, para dentro, responsável pela ingestão e degradação de moléculas extracelulares, move materiais a partir da membrana plasmática, através dos endossomos, para os lisossomos.

Para realizar sua função corretamente, cada vesícula de transporte que brota de um compartimento deve levar consigo somente as proteínas apropriadas para o seu destino e fusionar-se com a membrana-alvo apropriada. Uma vesícula carregando uma carga do aparelho de Golgi para a membrana plasmática, por exemplo, precisa excluir proteínas que devem permanecer no

Figura 15-18 As vesículas brotam de uma membrana e se fusionam com outras, carregando componentes de membrana e proteínas solúveis entre os compartimentos celulares. Cada compartimento encerra um espaço, ou lúmen, que é topologicamente equivalente ao espaço de fora da célula (ver Figura 11-19). O espaço extracelular e cada um dos compartimentos definidos por membranas (sombreamento *cinza)* se comunicam uns com os outros por meio do transporte de vesículas, como apresentado. Na via secretória de dentro para fora *(setas vermelhas)*, as moléculas proteicas são transportadas do RE, pelo aparelho de Golgi, para a membrana plasmática ou (via endossomos iniciais e tardios) aos lisossomos. Na via endocítica de fora para dentro (setas *verdes)*, moléculas extracelulares são ingeridas em vesículas derivadas da membrana plasmática e são entregues a endossomos iniciais e, então (por meio de endossomos tardios), aos lisossomos.

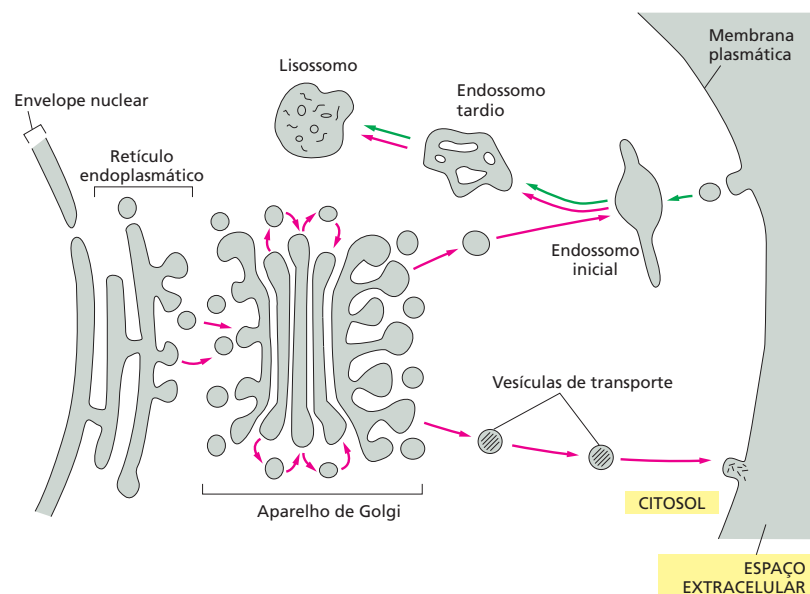
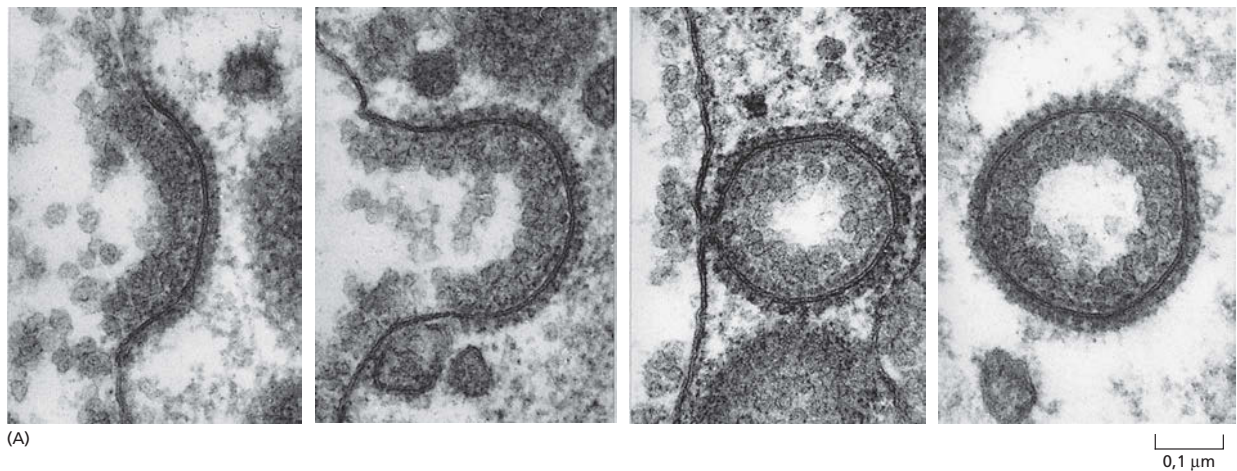



Figura 15-19 As moléculas de clatrina formam gaiolas em forma de cestas que ajudam a moldar membranas em vesículas. (A) Micrografias eletrônicas demonstrando a sequência de eventos na formação de uma vesícula revestida de clatrina a partir de uma fossa revestida. As fossas e vesículas revestidas de clatrina aqui apresentadas são anormalmente grandes e são formadas na membrana plasmática de um oócito de galinha. Elas estão envolvidas na captação de partículas constituídas de lipídeos e proteínas do oócito para formar a gema. (B) Micrografia eletrônica demonstrando inúmeras fossas e vesículas revestidas de clatrina brotando da superfície interna da membrana plasmática de células de pele cultivadas. (A, cortesia de M.M. Perry e A. B. Gilbert, *J. Cell Sci.* 39: 257-272, 1979. Com permissão de The Company of Biologists; B, de J. Heuser, *J. Cell Biol.* 84:560-583, 1980. Com permissão de Rockefeller University Press.)

aparelho de Golgi e fundir-se somente com a membrana plasmática e não com qualquer outra organela. Enquanto participa desse fluxo constante de componentes de membrana, cada organela deve manter a sua identidade distinta, ou seja, sua própria composição de proteínas e lipídeos. Todos esses eventos de reconhecimento dependem de proteínas associadas às membranas das vesículas de transporte. Como veremos, diferentes tipos de vesículas de transporte migram entre as várias organelas, cada uma carregando um conjunto distinto de moléculas.

O brotamento de vesículas é dirigido pela montagem de uma capa proteica

Em geral, as vesículas que brotam das membranas possuem uma capa proteica distinta na sua superfície citosólica e são, consequentemente, chamadas de **vesículas revestidas**. Depois de brotar de sua organela de origem, a vesícula perde o seu revestimento, permitindo que a membrana da vesícula interaja diretamente com a membrana na qual ela irá fusionar-se. As células produzem vários tipos de vesículas revestidas, cada uma com um tipo diferente de capa proteica. A capa serve pelo menos para duas funções: ela dá a forma à membrana em um brotamento e ajuda a captar moléculas para o transporte a ser realizado.

As vesículas mais bem estudadas são aquelas que possuem capas profusamente constituídas da proteína **clatrina**. Essas *vesículas revestidas de clatrina* brotam do aparelho de Golgi, na via secretória (para fora), e da membrana plasmática, na via endocítica (para dentro). Na membrana plasmática, por exemplo, cada vesícula se inicia como uma diminuta *fossa revestida de clatrina.* As moléculas de clatrina se montam em uma rede em forma de cesta na superfície citosólica da membrana, e é esse processo de montagem que começa a dar o formato da membrana em uma vesícula (**Figura 15-19**). Uma pequena proteína de ligação à GTP, denominada *dinamina,* associa-se como um anel ao redor do pescoço de cada fossa revestida invaginada profundamente na membrana. Juntamente com outras proteínas recrutadas ao pescoço da vesícula, a dinamina causa a constrição do anel, de forma a destacar a vesícula da membrana. Outros

tipos de vesículas de transporte, com diferentes proteínas de revestimento, também estão envolvidos no transporte vesicular. Elas se formam de maneira semelhante e carregam seus próprios conjuntos característicos de moléculas entre o RE, o aparelho de Golgi e a membrana plasmática. Contudo, como uma vesícula de transporte seleciona a sua carga particular? O mecanismo é mais bem conhecido para as vesículas revestidas de clatrina.

A própria clatrina não toma parte na captura de moléculas específicas para o transporte. Essa é a função de uma segunda classe de proteínas de revestimento chamadas de *adaptinas,* as quais seguram a capa de clatrina à membrana da vesícula e ajudam a selecionar as moléculas a serem carregadas no transporte. As moléculas para transporte na célula carregam *sinais de transporte* específicos, que são reconhecidos por *receptores de carga* localizados na membrana do compartimento. As adaptinas ajudam a capturar moléculas carga específicas pelo aprisionamento dos receptores de carga que se ligam a elas. Dessa forma, um conjunto selecionado de moléculas carga, ligadas aos seus receptores específicos, é incorporado ao lúmen de cada vesícula revestida de clatrina recém-formada (**Figura 15-20**). Existem tipos diferentes de adaptinas: aquelas que ligam os receptores de carga na membrana plasmática são diferentes daquelas que ligam os receptores de carga do aparelho de Golgi, refletindo as diferenças nas moléculas carga a partir de cada uma dessas fontes.

Outra classe de vesículas revestidas, chamadas de *vesículas COP-revestidas* (COP – proteína de revestimento, de *coat protein*), está envolvida no transporte de moléculas entre o RE e o aparelho de Golgi, e de uma parte do aparelho de Golgi para outra (**Tabela 15-4**).

Ancoramento de vesículas depende de aprisionamento e SNAREs

Após o desprendimento de uma vesícula de transporte da membrana, ela deve encontrar o seu caminho para o destino correto, visando a entregar o seu conteúdo. Na maioria dos casos, a vesícula é ativamente transportada por proteínas motoras que se movem ao longo das fibras do citoesqueleto, como discutido no Capítulo 17.

Figura 15-20 As vesículas revestidas de clatrina transportam moléculas carga selecionadas. Os receptores de carga, com as suas moléculas carga ligadas, são capturados pelas adaptinas, as quais também ligam as moléculas de clatrina à superfície citosólica da vesícula em brotamento (**Animação 15.5**). Proteínas de dinamina se acoplam ao pescoço das vesículas em formação; uma vez montadas, elas hidrolisam o seu GTP ligado e, com a ajuda de outras proteínas recrutadas para a área, destacam a vesícula. Após o brotamento estar completo, as proteínas de revestimento são removidas, e a vesícula nua pode fusionar-se com a sua membrana-alvo. Proteínas funcionalmente semelhantes são encontradas em outros tipos de vesículas revestidas.

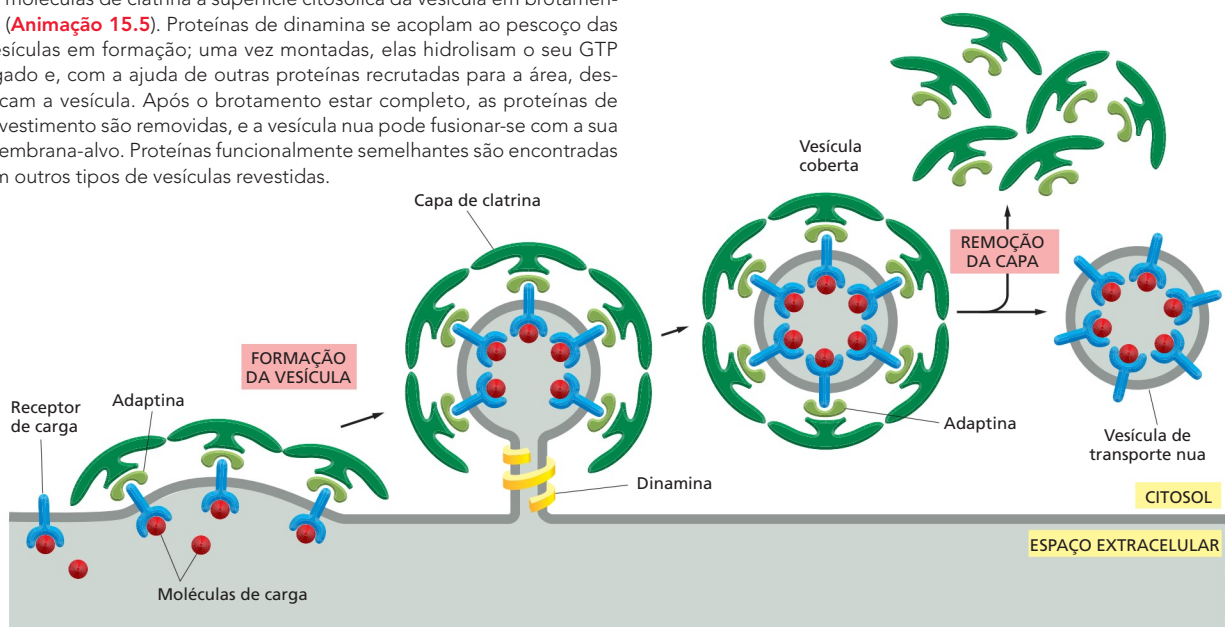
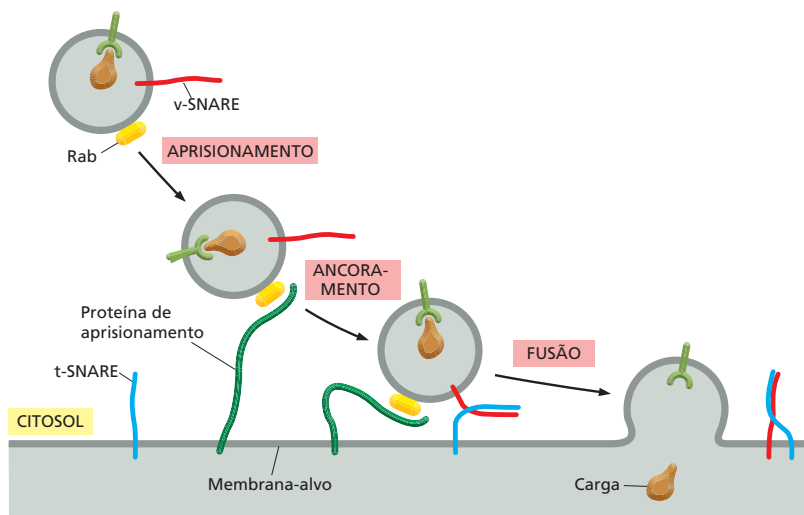



TABELA 15-4 Alguns tipos de vesículas revestidas

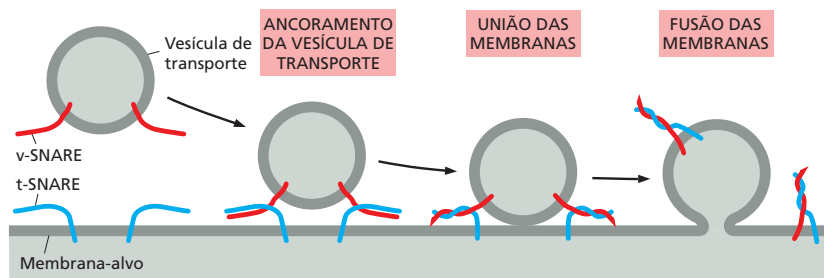
Tipos de vesículas revestidas	Proteínas de revestimento	Origem	Destino
Revestidas de clatrina	Clatrina + adaptina 1	Aparelho de Golgi	Lisossomo (via endossomos)
Revestidas de clatrina	Clatrina + adaptina 2	Membrana plasmática	Endossomas
Revestidas de COP	Proteínas COP	RE Cisternas de Golgi Aparelho de Golgi	Aparelho de Golgi Cisternas de Golgi RE

Uma vez que a vesícula de transporte tenha atingido seu alvo, ela tem de reconhecer e se ancorar na organela. Somente então a membrana da vesícula pode fundir-se à membrana-alvo e descarregar a sua carga. A impressionante especificidade do transporte vesicular sugere que cada tipo de vesículas de transporte na célula exponha na sua superfície marcas moleculares que identificam a vesícula de acordo com a sua origem e conteúdo. Esses marcadores devem ser reconhecidos por receptores complementares localizados na membrana-alvo, incluindo a membrana plasmática. Esse processo de identificação depende de uma família de proteínas denominada **proteínas Rab**. As proteínas Rab na superfície da vesícula são reconhecidas pelas proteínas de aprisionamento na superfície citosólica da membrana-alvo. Cada organela e cada tipo de vesícula de transporte carregam uma única combinação de proteínas Rab, que serve como marcador molecular para identificar cada tipo de membrana. Esse sistema codificador de Rab e proteínas de aprisionamento ajuda a assegurar que as vesículas de transporte se fusionem apenas com a membrana correta. Um reconhecimento adicional é fornecido por uma família de proteínas transmembrana relacionadas, chamadas de **SNAREs**. Uma vez que a proteína de aprisionamento tenha capturado a vesícula segurando firmemente sua proteína Rab, as SNAREs sobre a vesícula (chamadas de v-SNAREs) interagem com SNAREs complementares sobre a membrana-alvo (chamadas de t-SNARES), ancorando a vesícula no seu local (Figura 15-21).

Uma vez que a vesícula de transporte tenha reconhecido a sua membrana-alvo e lá ancorado, ela tem de fusionar-se com a membrana para entregar a sua carga. A fusão não só permite a entrega do conteúdo da vesícula no interior da organela-alvo, mas também adiciona a membrana da vesícula à membrana da organela. Entretanto, a fusão das membranas nem sempre se segue imediatamente ao ancoramento e deve muitas vezes aguardar para ser desencadeada

QUESTÃO 15-5

O brotamento de vesículas revestidas de clatrina pode ser observado em fragmentos de membranas plasmáticas eucarióticas quando adaptinas, clatrina e dinamina-GTP são adicionadas. O que você observaria se fosse omitido: (A) adaptinas, (B) clatrina ou (C) dinamina? (D) O que você observaria se os fragmentos de membrana plasmática fossem provenientes de uma célula procariótica?

Figura 15-21 As proteínas Rab e SNAREs auxiliam diretamente no transporte de vesículas para suas membranas-alvo. Uma proteína de aprisionamento filamentosa sobre uma membrana se liga à proteína Rab na superfície de uma vesícula. Essa interação permite à vesícula ancorar na sua membrana-alvo. A v-SNARE sobre a vesícula então se liga a uma t-SNARE complementar sobre a membrana-alvo. Enquanto as proteínas Rab e as de aprisionamento fornecem o reconhecimento inicial entre uma vesícula e a sua membrana-alvo, o pareamento de SNAREs complementares também ajuda a assegurar que as vesículas de transporte alcancem suas membranas-alvo apropriadas.

Figura 15-22 As proteínas SNAREs são importantes na fusão de membranas. O pareamento de v-SNAREs e t-SNAREs força as duas bicamadas lipídicas à justaposição. A força das SNAREs se enrolando espremem qualquer molécula de água que se mantenha presa entre as duas membranas, permitindo que seus lipídeos fluam juntos para formar uma bicamada contínua. Em uma célula, outras proteínas recrutadas para o sítio de fusão presumivelmente cooperam com as SNAREs para iniciar a fusão. Proteínas adicionais ajudam a separar as SNAREs de modo que possam ser usadas novamente.

por um sinal específico. Enquanto o ancoramento requer somente que as duas membranas se aproximem o suficiente para que haja a interação entre as proteínas protuberantes das duas bicamadas lipídicas, a fusão requer uma aproximação ainda mais íntima: as duas bicamadas lipídicas devem chegar a distâncias de 1,5 nm uma da outra, de forma que seus lipídeos possam misturar-se. Para tal aproximação, a água deve ser removida da superfície hidrofílica da membrana – um processo muito desfavorável energeticamente, prevenindo assim que as membranas se fusionem de forma aleatória. Todas as fusões de membranas nas células devem ser catalisadas por proteínas especializadas que se agrupam no sítio de fusão para formar um complexo de fusão, que fornece os meios para cruzar essa barreira de energia. As próprias proteínas SNARE têm um papel central no processo de fusão: após o pareamento, v-SNAREs e t-SNAREs se enredam umas nas outras, agindo como uma manivela que puxa as duas membranas para bem próximo uma da outra (**Figura 15-22**).

VIAS SECRETORAS

O tráfego vesicular não está confinado somente ao interior da célula. Ele se estende para a e a partir da membrana plasmática. Proteínas recém-sintetizadas, lipídeos e carboidratos são distribuídos do RE, via aparelho de Golgi, para a superfície celular pelas vesículas de transporte que se fundem à membrana plasmática em um processo chamado de **exocitose**. Cada molécula que viaja ao longo dessa rota passa por uma sequência fixa de compartimentos definidos por membranas e é quimicamente modificada durante a rota.

Nesta seção, seguiremos a rota de exteriorização de proteínas à medida que migram do RE, onde elas são produzidas e modificadas, pelo aparelho de Golgi, sofrendo outras modificações e distribuições, para a membrana plasmática. À medida que uma proteína migra de um compartimento para outro, ela é monitorada de forma a verificar se foi apropriadamente estruturada e conjugada aos seus complementos adequados, para que somente as proteínas corretamente construídas sejam liberadas na superfície celular, ao passo que todas as outras, que frequentemente é a maioria, são degradadas pela célula.

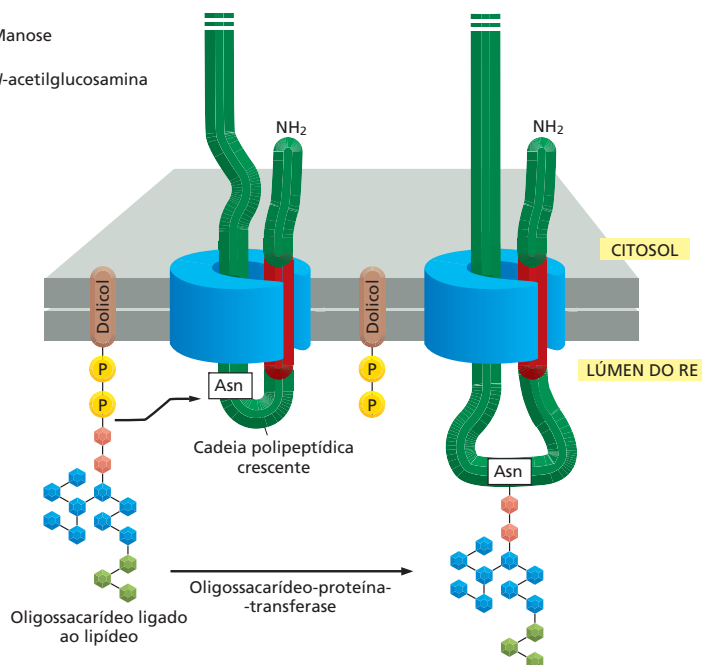
A maior parte das proteínas é modificada covalentemente no RE

A maioria das proteínas que entram no RE é quimicamente modificada nesse compartimento. *Pontes dissulfídicas* são formadas pela oxidação de pares de cadeias laterais de cisteínas (ver Figura 4-26), uma reação catalisada por uma enzima que reside no lúmen do RE. As pontes dissulfídicas ajudam a estabilizar a estrutura daquelas proteínas que podem encontrar mudanças de pH e enzimas degradativas no exterior da célula – depois de serem secretadas ou depois de serem incorporadas à membrana plasmática. Em virtude do ambiente redutor no citosol, as pontes dissulfídicas não se formam neste.

Muitas das proteínas que entram no lúmen do RE ou na membrana do RE são convertidas em glicoproteínas no RE pela ligação covalente de cadeias laterais curtas de oligossacarídeos. Esse processo de *glicosilação* ocorre por enzimas de glicosilação encontradas no RE e ausentes no citosol. Poucas proteínas

do citosol são glicosiladas, e aquelas que são possuem somente um resíduo de açúcar ligado a elas. Os oligossacarídeos nas proteínas servem para várias funções, dependendo da proteína. Eles podem proteger a proteína da degradação, retê-la no RE até que seja apropriadamente processada (enovelada) ou ajudar a dirigi-la para a organela apropriada, servindo como um sinal de transporte para o empacotamento da proteína em vesículas adequadas de transporte. Quando expostos na superfície celular, os oligossacarídeos formam parte da camada celular de carboidratos (ver Figura 11-35) e podem funcionar no reconhecimento de uma célula por outra.

No RE, os açúcares não são individualmente adicionados, um a um, à proteína para criar a cadeia lateral oligossacarídica. Ao contrário, um oligossacarídeo ramificado pré-formado, contendo um total de 14 açúcares, é anexado em bloco a todas as proteínas que carregam um sítio apropriado de glicosilação. O oligossacarídeo é originalmente preso a um lipídeo especializado, chamado de *dolicol,* na membrana do RE; então é transferido para o grupo amino (NH_2) de uma cadeia lateral de asparagina da proteína, imediatamente após a imersão da asparagina-alvo no lúmen do RE durante a translocação proteica (**Figura 15-23**). A adição ocorre em uma única etapa enzimática catalisada por uma enzima ligada à membrana (uma oligossacarídeo-proteína-transferase) que possui o seu sítio ativo exposto na face luminal da membrana do RE, o que explica por que as proteínas citosólicas não são glicosiladas dessa maneira. Uma sequência simples de três aminoácidos, na qual a asparagina é um deles, define quais resíduos de asparagina em uma proteína recebem o oligossacarídeo. As cadeias laterais oligossacarídicas ligadas ao grupo NH_2 da asparagina em uma proteína são ditas *N-ligadas* e são a forma mais comum de ligação encontrada em glicoproteínas.

A adição do oligossacarídeo de 14 açúcares no RE é somente a primeira etapa de uma série de outras modificações futuras, antes que a glicoproteína madura surja no final da via secretória. Apesar da similaridade inicial, os oligossacarídeos *N*-ligados em glicoproteínas maduras são muito diversos. Toda a diversidade é resultante de extensivas modificações da estrutura precursora original apresentada na Figura 15-23. Esse *processamento oligossacarídico* inicia no RE e continua no aparelho de Golgi.

QUESTÃO 15-6

Por que deve ser vantajoso adicionar um bloco de 14 açúcares construído previamente a uma proteína no RE, em vez de construir a cadeia de açúcar etapa por etapa na superfície da proteína, pela adição sequencial de açúcares por enzimas individuais?

Figura 15-23 Muitas proteínas são glicosiladas no RE. Quase tão logo uma cadeia polipeptídica entra no lúmen do RE, ela é glicosilada pela adição de cadeias laterais oligossacarídicas a asparaginas especiais do polipeptídeo. Cada cadeia oligossacarídica é transferida como uma unidade intacta para a asparagina a partir de um lipídeo denominado dolicol, catalisado pela enzima oligossacaril-transferase (não mostrada). As asparaginas que são glicosiladas estão sempre presentes em uma sequência tripeptídica asparagina-X-serina ou asparagina-X-treonina, onde X pode ser qualquer aminoácido.

A saída do RE é controlada para garantir a qualidade proteica

Algumas proteínas produzidas no RE são destinadas a funcionar nessa organela. Elas são retidas no RE (e retornam ao RE quando escapam pelo aparelho de Golgi) por uma sequência C-terminal de quatro aminoácidos chamada de *sinal de retenção no RE* (ver Tabela 15-3, p. 502). Esse sinal de retenção é reconhecido por uma proteína receptora ligada à membrana no RE e no aparelho de Golgi. A maioria das proteínas que entra no RE, entretanto, é destinada a outros locais; elas são empacotadas em vesículas de transporte que brotam do RE e se fusionam com o aparelho de Golgi. A saída do RE é bastante seletiva. As proteínas processadas incorretamente e proteínas diméricas ou multiméricas que tenham falhas de montagem são retidas ativamente no RE pela ligação a *proteínas chaperonas* que lá residem. A interação com as chaperonas retém as proteínas no RE até que ocorra o processamento apropriado; caso contrário, as proteínas são degradadas em última instância (**Figura 15-24**). Moléculas de anticorpos, por exemplo, são constituídas por quatro cadeias polipeptídicas (ver Figura 4-29) que se montam na molécula de anticorpo completa no RE. Os anticorpos parcialmente montados são retidos no RE até que todas as quatro cadeias polipeptídicas tenham sido adicionadas; qualquer molécula de anticorpo que falhe em montar-se adequadamente é degradada em última instância. Dessa forma, o RE controla a qualidade das proteínas que exporta para o aparelho de Golgi.

Algumas vezes, entretanto, esse mecanismo de controle de qualidade pode ser prejudicial ao organismo. Por exemplo, a mutação predominante que causa a doença genética *fibrose cística,* que provoca grave degeneração do pulmão, produz uma proteína de transporte da membrana plasmática que é levemente malformada; apesar de a proteína mutante poder funcionar de forma perfeitamente normal como um canal de cloro se alcançasse a membrana plasmática, ela é retida no RE, com drásticas consequências. A doença devastadora resulta não só porque a mutação inativa uma importante proteína, mas também porque a proteína ativa é descartada pelas células antes que lhe seja dada a oportunidade de funcionar.

O tamanho do RE é controlado pela quantidade de proteína que flui por ele

Embora as chaperonas ajudem as proteínas no RE a se enovelarem adequadamente e reter aquelas que não se enovelam, quando a síntese proteica é vigorosa, o sistema pode tornar-se sobrecarregado. Quando a produção proteica da célula excede a capacidade de transporte e enovelamento do seu RE, as proteínas malenoveladas começam a acumular-se. Essas proteínas aberrantes na verdade servem como um sinal para orientar a célula a produzir mais RE. Isso ocorre pela ativação de um grupo especial de receptores que residem na membrana do RE, que, por sua vez, ativam um vasto programa de transcrição chamado de **resposta de proteína desenovelada** (**UPR**, de *unfolded protein response*). O programa UPR estimula a célula a produzir mais RE, incluindo toda a maquinaria molecular necessária para reabilitar o enovelamento e o processamento apropriados da proteína (**Figura 15-25**).

O programa UPR permite às células ajustar o tamanho do RE de acordo com a necessidade, de modo que o carregamento de proteínas que entram na via

Figura 15-24 As chaperonas previnem que proteínas malformadas ou parcialmente montadas deixem o RE. As proteínas malformadas se ligam a proteínas chaperonas do lúmen do RE e são lá retidas, ao passo que proteínas normalmente processadas são transportadas em vesículas de transporte para o aparelho de Golgi. Se as proteínas malformadas falham em reenovelar-se normalmente, elas serão transportadas de volta para o citosol, onde serão degradadas.

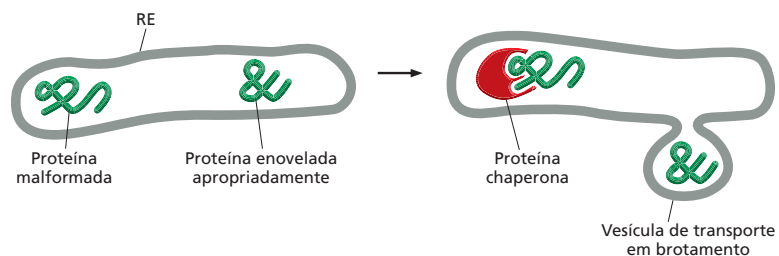
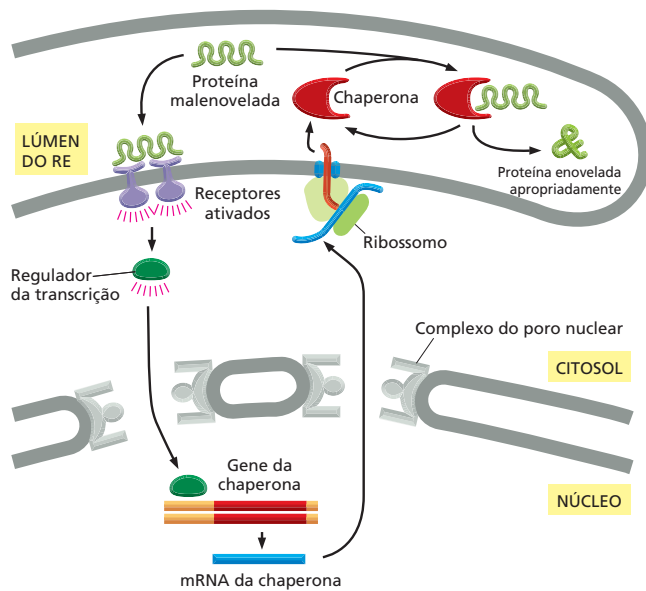



Figura 15-25 Proteínas malenoveladas no lúmen do RE acionam a produção de chaperonas e a expansão do RE. As proteínas malenoveladas se ligam a receptores que estimulam a produção de um regulador da transcrição. Essa proteína é translocada para o núcleo, onde ativa genes que codificam para chaperonas e outros componentes do RE, promovendo, assim, o enovelamento e o processamento apropriados das proteínas. O sistema é conhecido como resposta de proteína desenovelada.

secretora seja enovelado com eficiência e de modo apropriado. Entretanto, em alguns casos, mesmo um RE expandido pode tornar-se sobrecarregado. Se um equilíbrio apropriado não puder ser restabelecido – e proteínas malenoveladas continuarem a acumular-se –, o programa UPR pode direcionar a célula a se autodestruir por apoptose. Tal situação pode surgir em diabete iniciado em adultos, onde os tecidos do corpo gradualmente se tornam resistentes aos efeitos da insulina. À medida que as células secretoras de insulina no pâncreas são convocadas a produzir mais e mais insulina, seu RE poderá alcançar a capacidade máxima, ponto no qual a expansão adicional se torna fisiologicamente impossível. O programa UPR pode então acionar a morte celular. Infelizmente, quanto mais células secretoras de insulina forem eliminadas, mais decairá a demanda para produzir mais insulina para as células sobreviventes, exigindo demais dos seus REs e tornando-os mais suscetíveis a morrer também. Essa perda ascendente de células produtoras de insulina exacerba a doença.

As proteínas são posteriormente modificadas e distribuídas no aparelho de Golgi

O **aparelho de Golgi** está, em geral, localizado próximo ao núcleo celular e, em células animais, está frequentemente próximo ao centrossomo – uma pequena estrutura próxima ao centro celular. O aparelho de Golgi consiste em uma coleção de sacos achatados, sacos definidos por membranas *(cisternas),* que estão empilhados como pratos. Cada pilha contém de 3-20 cisternas (**Figura 15-26**). O número de pilhas de Golgi por célula varia grandemente, dependendo do tipo celular: algumas células contêm uma única pilha grande, e outras contêm centenas de pilhas muito pequenas.

Cada pilha de Golgi possui duas faces distintas: uma face de entrada, ou *cis,* e uma face de saída, ou *trans.* A face *cis* é adjacente ao RE, e a face *trans* aponta em direção à membrana plasmática. A cisterna mais externa de cada face está conectada a uma rede de vesículas e tubos membranosos interconectados (ver Figura 15-26A). As proteínas solúveis e membrana entram na *rede cis de Golgi* pelas vesículas de transporte derivadas do RE. As proteínas viajam pelas cisternas em sequência por meio de vesículas de transporte que brotam de uma cisterna e se fusionam com a próxima. As proteínas saem da *rede trans de Golgi* em vesículas de transporte destinadas para a superfície celular ou para outro compartimento (ver Figura 15-18). Acredita-se que tanto a rede *cis* como a rede *trans de Golgi* são importantes para a distribuição proteica: as proteínas que en-

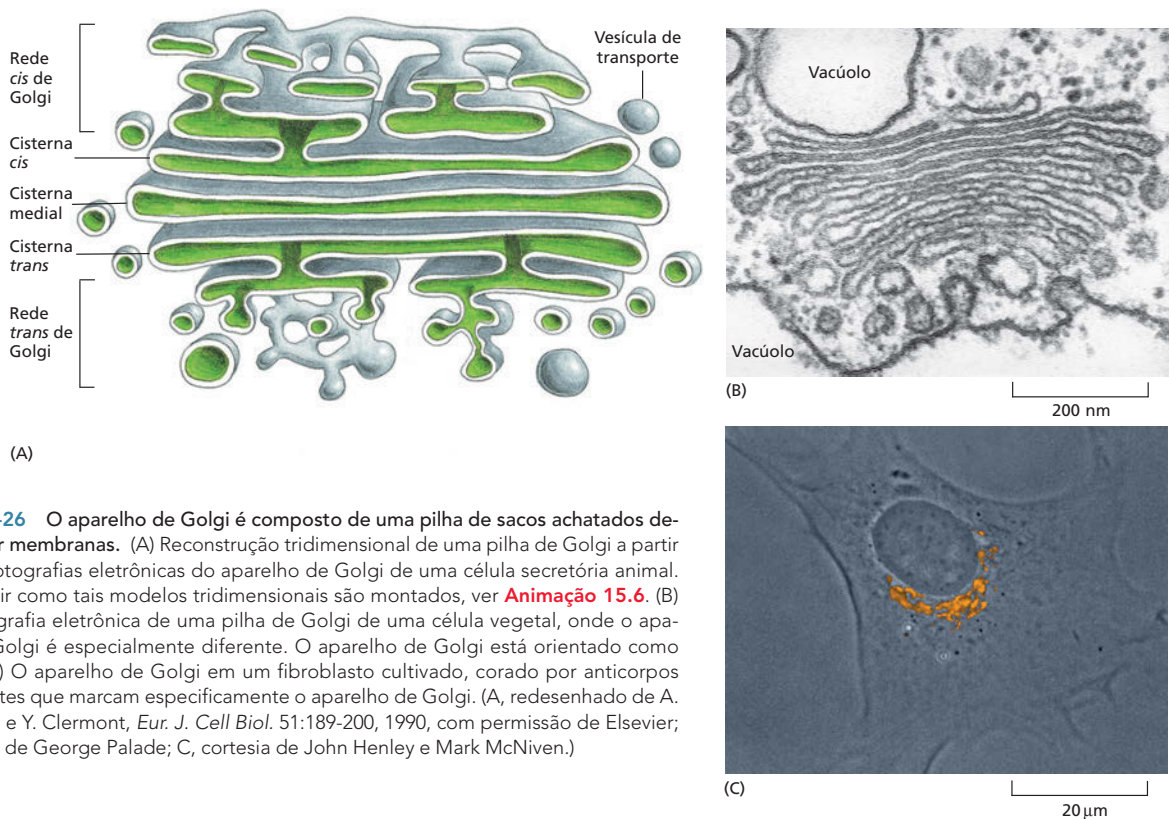



Figura 15-26 O aparelho de Golgi é composto de uma pilha de sacos achatados definidos por membranas. (A) Reconstrução tridimensional de uma pilha de Golgi a partir de microfotografias eletrônicas do aparelho de Golgi de uma célula secretória animal. Para assistir como tais modelos tridimensionais são montados, ver **Animação 15.6**. (B) Microfotografia eletrônica de uma pilha de Golgi de uma célula vegetal, onde o aparelho de Golgi é especialmente diferente. O aparelho de Golgi está orientado como em (A). (C) O aparelho de Golgi em um fibroblasto cultivado, corado por anticorpos fluorescentes que marcam especificamente o aparelho de Golgi. (A, redesenhado de A. Rambourg e Y. Clermont, *Eur. J. Cell Biol.* 51:189-200, 1990, com permissão de Elsevier; B, cortesia de George Palade; C, cortesia de John Henley e Mark McNiven.)

tram na rede *cis* de Golgi podem mover-se adiante pela pilha de Golgi ou, se elas contêm um sinal de retenção no RE, ser retornadas para o RE; as proteínas que saem da rede *trans* de Golgi são distribuídas de acordo com o seu destino, para os lisossomos ou para a superfície celular. Discutiremos alguns exemplos de distribuição pela rede *trans* de Golgi mais adiante e apresentaremos alguns dos métodos para rastrear proteínas por vias secretórias da célula em **Como Sabemos**, p. 520-521.

Muitos dos grupos oligossacarídicos que são adicionados às proteínas no RE sofrem modificações posteriores no aparelho de Golgi. Sobre algumas proteínas, por exemplo, cadeias complexas de oligossacarídeos são criadas por processos bastante ordenados onde açúcares são adicionados e removidos por uma série de enzimas que atuam em uma sequência rigidamente determinada à medida que as proteínas passam através da pilha de Golgi. Existe uma clara correlação entre a posição de uma enzima na cadeia de eventos de processamento e a sua localização na pilha de Golgi: enzimas que atuam no início são encontradas em cisternas próximas à face *cis,* e as enzimas que atuam mais tarde são encontradas nas cisternas próximas à face *trans.*

As proteínas secretórias são liberadas da célula por exocitose

Em todas as células eucarióticas, há uma corrente fixa de vesículas que brota da rede *trans* de Golgi e que se fusiona com a membrana plasmática. Essa *via constitutiva de exocitose* opera continuamente e supre a membrana plasmática de proteínas e lipídeos recém-formados (**Animação 15.7**). É a via pela qual a membrana plasmática cresce quando as células aumentam antes de se dividirem. A via constitutiva também carrega proteínas para a superfície celular para serem liberadas ao exterior, um processo chamado de **secreção**. Algumas das proteínas liberadas aderem à superfície celular, onde se tornam proteínas periféricas da membrana plasmática; algumas são incorporadas na

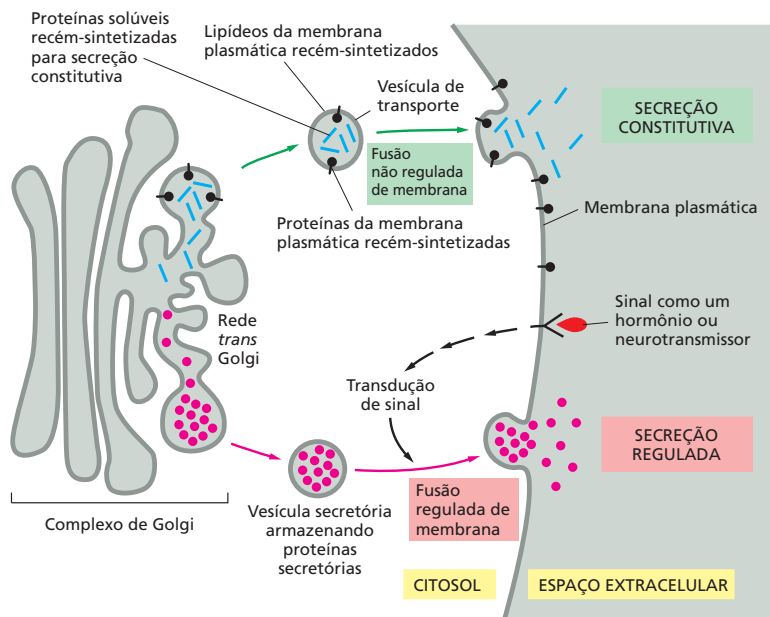



Figura 15-27 Em células secretórias, as vias regulada e constitutiva da exocitose divergem na rede *trans* de Golgi. Muitas proteínas solúveis são continuamente secretadas pela célula pela via secretória constitutiva, a qual opera em todas as células (**Animação 15.8**). Essa via também supre continuamente a membrana plasmática de lipídeos e proteínas recém-sintetizados. As células secretórias especializadas têm, em adição, uma via regulada de exocitose, pela qual proteínas selecionadas na rede *trans* de Golgi são desviadas para vesículas secretórias, onde as proteínas são concentradas e armazenadas até que um sinal extracelular estimule sua secreção. Não se sabe como os agregados de proteínas secretórias são segregados em vesículas secretórias. As vesículas secretórias têm proteínas ímpares em suas membranas; talvez algumas dessas proteínas ajam como receptores para agregados de proteínas secretórias na rede *trans* de Golgi.

matriz extracelular; outras ainda se difundem no líquido extracelular para nutrir ou sinalizar outras células. Uma vez que a entrada nessa via não seletiva não requer uma sequência-sinal particular (como aquelas que direcionam as proteínas aos lisossomos ou de volta ao RE), ela é algumas vezes referida como a *via-padrão.*

Em adição à via constitutiva de exocitose, que opera continuamente em todas as células eucarióticas, há uma *via regulada de exocitose,* a qual opera apenas em células que são especializadas em secreção. *Células secretórias* especializadas produzem quantidades de um produto em particular, como hormônios, muco ou enzimas digestórias, os quais são estocados em **vesículas secretórias** até a liberação. Essas vesículas brotam da rede *trans* de Golgi e se acumulam perto da membrana plasmática. Lá elas aguardam o sinal extracelular que irá estimulá-las a se fusionar com a membrana plasmática e liberar seu conteúdo ao exterior celular (**Figura 15-27**). Um aumento na glicose do sangue, por exemplo, sinaliza as células hepáticas a secretar o hormônio insulina (**Figura 15-28**).

As proteínas destinadas às vesículas secretórias são distribuídas e empacotadas na rede *trans* de Golgi. Proteínas que se movimentam por essa via têm propriedades de superfície especiais que as conduzem a agregar-se umas com as outras

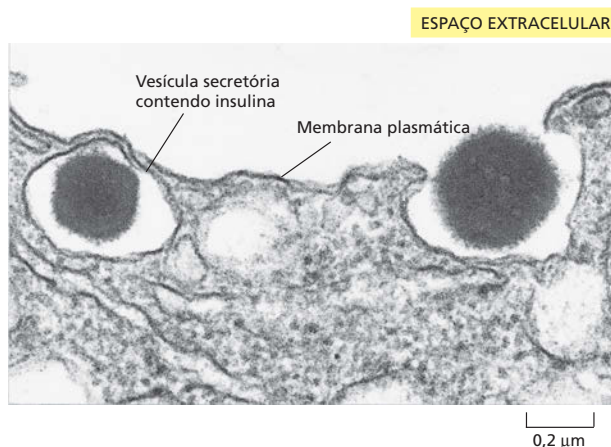



Figura 15-28 As vesículas secretórias empacotam e descarregam agregados concentrados de proteínas. A microfotografia eletrônica mostra a liberação de insulina para o espaço extracelular a partir de uma vesícula secretória de uma célula pancreática β. A insulina é armazenada de uma forma bastante concentrada em cada vesícula secretória e é liberada somente quando a célula é sinalizada a secretar por um aumento dos níveis de glicose no sangue. (Cortesia de Lelio Orci, de L. Orci, J.D. Vassali e A. Perrelet, *Sci. Am.* 259:85-94, 1988. Com permissão de Scientific American.)

COMO SABEMOS:
RASTREANDO PROTEÍNAS E VESÍCULAS DE TRANSPORTE

Ao longo dos anos, os biólogos têm-se beneficiado de uma variedade de técnicas para desvendar as vias e os mecanismos pelos quais as proteínas são distribuídas e transportadas para dentro e para fora da célula e de suas organelas. Como vimos, transferindo-se uma sequência-sinal de RE a uma proteína citosólica, os pesquisadores confirmaram que tal sinal peptídico serve para direcionar as proteínas a um compartimento intracelular específico – nesse exemplo, o RE (ver Figura 15-6). No entanto, tais experimentos de troca de sinais não são o único meio de rastrear o progresso de uma proteína pela célula. Técnicas de bioquímica, genética, biologia molecular e microscopia também proporcionam recursos para estudar como as proteínas se movem de um compartimento celular a outro.

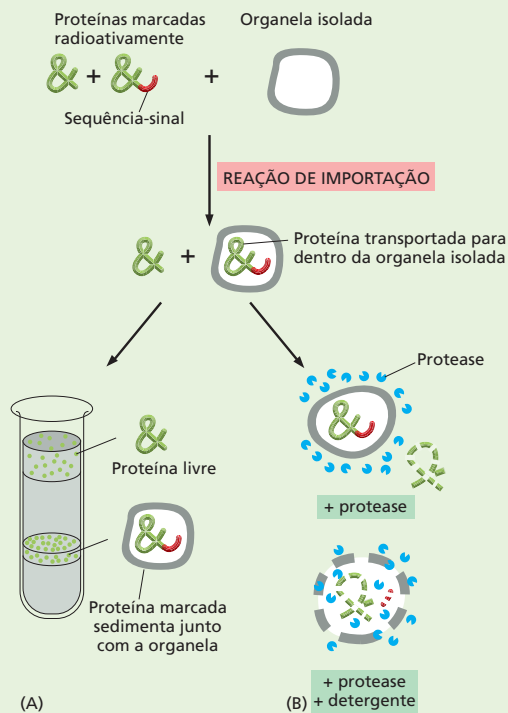



Figura 15-29 **Vários métodos podem ser utilizados para determinar se uma proteína contendo uma sequência-sinal em especial é transportada a uma preparação de organelas isoladas.** (A) A proteína marcada com ou sem uma sequência-sinal é incubada com as organelas, e a preparação é centrifugada. Apenas as proteínas marcadas que contêm a sequência-sinal serão transportadas e, portanto, devem ser cofracionadas com as organelas. (B) As proteínas marcadas são incubadas com as organelas, e uma protease é adicionada à preparação. Uma proteína transportada será seletivamente protegida da digestão pela protease; a adição de um detergente que rompe a membrana da organela eliminará a proteção, e a proteína transportada também será degradada.

Em alguns casos, esses métodos podem ser usados para rastrear a migração de proteínas e vesículas de transporte em tempo real dentro de células vivas.

Em um tubo

Uma proteína contendo uma sequência-sinal pode ser introduzida em uma preparação de organelas isoladas em um tubo de ensaio. Essa mistura pode ser então testada para ver se a proteína será capturada pela organela examinada. A proteína é geralmente produzida *in vitro* por tradução fora da célula de um mRNA purificado que codifica um polipeptídeo; nesse processo, aminoácidos radioativos podem ser usados para marcar a proteína, de maneira que será fácil isolá-la e segui-la. A proteína marcada é incubada com a organela selecionada, e sua translocação é monitorada por um de vários métodos diferentes (**Figura 15-29**).

Pergunte a uma levedura

O movimento de proteínas entre diferentes compartimentos celulares pelas vesículas de transporte tem sido extensivamente estudado usando técnicas genéticas. Estudos de células de levedura mutantes que são defeituosas para a secreção a altas temperaturas identificaram mais de 25 genes que estão envolvidos em exocitose. Muitos desses genes mutantes codificam proteínas sensíveis à temperatura que estão envolvidas no transporte e na secreção. Essas proteínas mutantes podem funcionar normalmente a 25 °C, mas quando as células de levedura são colocadas a 35 °C, elas são inativadas. Como resultado, quando os pesquisadores aumentam a temperatura, as proteínas destinadas à secreção acumulam inapropriadamente no RE, no aparelho de Golgi ou nas vesículas de transporte (**Figura 15-30**).

Nos filmes

Talvez o método mais dramático para rastrear uma proteína à medida que se move pela célula envolva a marcação do polipeptídeo com a proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein,* GFP). Usando as técnicas de engenharia genética discutidas no Capítulo 10, essa pequena proteína pode ser fusionada a outras proteínas celulares. Afortunadamente, para a maioria das proteínas estudadas, a adição de GFP não perturba a função ou o transporte normal da molécula. O movimento de uma proteína marcada com GFP pode ser, então, monitorado em uma célula viva com um microscópio de fluorescência.

Proteínas fusionadas à GFP são amplamente utilizadas para estudar a localização e o movimento das proteínas nas células (**Figura 15-31**). A GFP fusionada a proteínas que se movimentam para dentro e para fora do núcleo, por exemplo, pode ser usada para estudar eventos de trans-

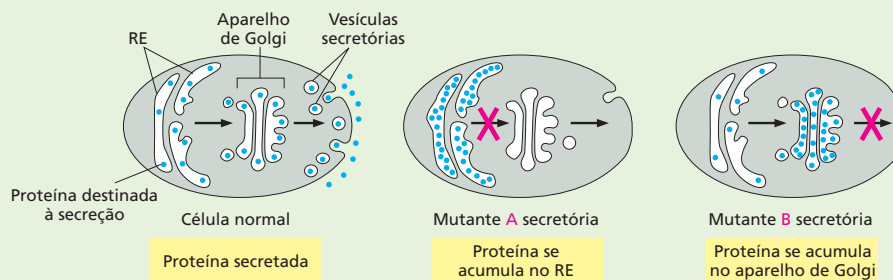



Figura 15-30 **Mutantes sensíveis à temperatura têm sido usados para dissecar a via secretória de proteínas em leveduras.** Mutações nos genes envolvidos em diferentes estágios do processo de transporte resultam no acúmulo de proteínas no RE, no aparelho de Golgi ou em outras vesículas de transporte. Por exemplo, uma mutação A que bloqueia o transporte do RE ao aparelho de Golgi ocasiona um armazenamento de proteínas no RE. Uma mutação B que bloqueia a saída de proteínas do aparelho de Golgi leva ao acúmulo de proteínas nessa organela.

porte nuclear. A GFP fusionada a proteínas da membrana plasmática pode ser usada para medir a cinética de seu movimento pela via secretória. Animações demonstrando o poder e a beleza dessas técnicas estão incluídas no DVD que acompanha este livro (**Animação 15.1**, **Animação 15.7**, **Animação 15.8** e **Animação 15.11**).

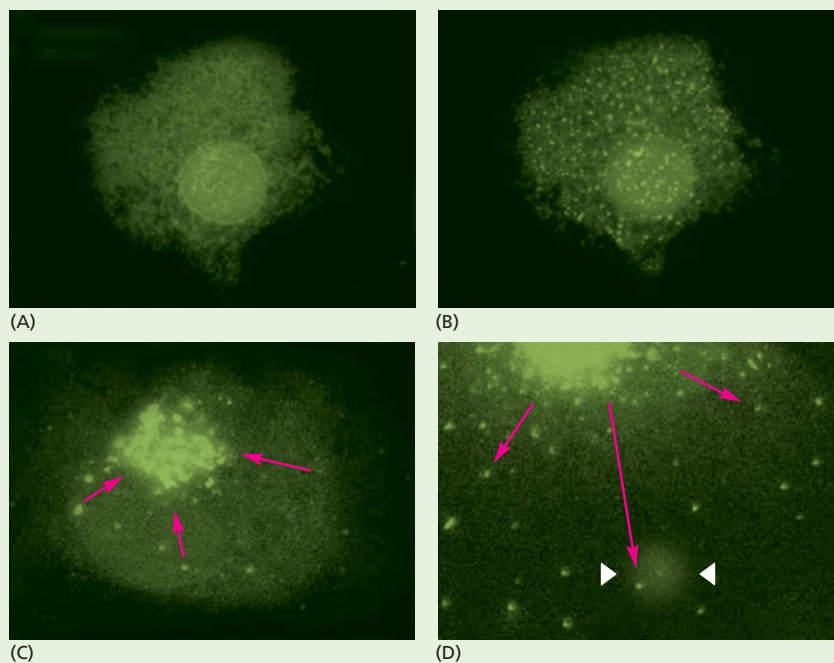



Figura 15-31 **A fusão com GFP permite o rastreamento de proteínas pela célula.** Nesse experimento, a GFP está fusionada a uma proteína da capa viral e expressa em células em cultura. Em uma célula infectada, a proteína viral se move através da via secretória do RE à superfície celular, onde a partícula viral será montada. A proteína da capa viral usada nesse experimento contém uma mutação que permite a exportação do RE apenas em baixas temperaturas. (A) Em altas temperaturas, a proteína de fusão marca o RE. (B) À medida que a temperatura baixa, a proteína de fusão com GFP rapidamente se acumula nos sítios de saída do RE. (C) A proteína de fusão, então, desloca-se para o aparelho de Golgi. (D) Finalmente, a proteína de fusão é entregue à membrana plasmática, mostrada aqui em uma visão mais próxima. O halo entre as duas setas marca o ponto onde uma única vesícula se fundiu, expelindo a proteína da capa viral na membrana plasmática. (A-D, cortesia de Jennifer Lippincott-Schwartz.)

sob as condições iônicas (pH ácido e alta concentração de Ca^{2+}), prevalecendo na rede *trans* de Golgi. As proteínas agregadas são empacotadas em vesículas secretórias, as quais se destacam da rede e aguardam por um sinal para se fusionarem com a membrana plasmática. As proteínas secretadas pela via constitutiva, ao contrário, não se agregam e são, portanto, carregadas automaticamente à membrana plasmática pelas vesículas de transporte da via constitutiva. A agregação seletiva tem outra função: ela permite que as proteínas de secreção sejam empacotadas em vesículas secretórias em concentrações muito mais altas do que a concentração de proteínas não agregadas no lúmen do Golgi. O aumento da concentração pode alcançar até 200 vezes, permitindo que células secretórias liberem quantidades da proteína prontamente quando provocadas a fazê-lo (ver Figura 15-28).

Quando uma vesícula secretória ou vesícula de transporte se fusiona com a membrana plasmática e descarrega seu conteúdo por exocitose, sua membrana se torna parte da membrana plasmática. Embora isso devesse aumentar enormemente a área de superfície da membrana plasmática, acontece apenas transitoriamente, porque componentes de membrana são removidos de outras regiões da superfície por endocitose quase de forma tão rápida quanto elas são adicionadas por exocitose. Essa remoção retorna tanto lipídeos como proteínas da membrana das vesículas à rede de Golgi, onde elas podem ser utilizadas novamente.

QUESTÃO 15-7

O que você esperaria que acontecesse em células que secretam grandes quantidades de proteínas pela via secretória regulada se as condições iônicas no lúmen do RE pudessem ser mudadas para assemelhar-se às do lúmen da rede *trans* de Golgi?

VIAS ENDOCÍTICAS

As células eucarióticas estão continuamente capturando líquido, assim como moléculas grandes e pequenas, pelo processo de endocitose. Células especializadas são também capazes de internalizar grandes partículas e até mesmo outras células. O material a ser ingerido é progressivamente encerrado por uma pequena porção da membrana plasmática, que primeiro brota para dentro e então se destaca para formar uma *vesícula endocítica* intracelular. O material ingerido é, enfim, entregue aos lisossomos, onde é digerido. Os metabólitos gerados pela digestão são transferidos diretamente para fora do lisossomo no citosol, onde eles podem ser usados pela célula.

Distinguem-se dois tipos principais de **endocitose** em função do tamanho das vesículas endocíticas formadas. A *pinocitose* ("o beber da célula") envolve a ingestão de líquido e de moléculas por pequenas vesículas (< 150 nm de diâmetro). A *fagocitose* ("o comer da célula") envolve a ingestão de partículas grandes, tais como microrganismos e fragmentos celulares, por meio de grandes vesículas chamadas de *fagossomos* (geralmente > 250 nm de diâmetro). Enquanto todas as células eucarióticas estão continuamente ingerindo líquido e moléculas por pinocitose, grandes partículas são ingeridas principalmente por *células fagocitárias* especializadas.

Nesta seção final do capítulo, seguiremos o curso da via endocítica da membrana plasmática ao lisossomo. Começaremos por considerar a captura de grandes partículas pela fagocitose.

As células fagocitárias especializadas ingerem grandes partículas

A forma mais crítica de endocitose, a **fagocitose**, foi pela primeira vez observada há mais de cem anos. Em protozoários, a fagocitose é a forma de alimentar-se: esses eucariotos unicelulares ingerem grandes partículas, como bactérias, capturando-as em fagossomos (**Animação 15.9**); Os fagossomos então se fusionam com lisossomos, onde as partículas nutrientes são digeridas. Poucas células em organismos multicelulares são capazes de ingerir muitas partículas eficientemente. No intestino animal, por exemplo, grandes partículas de comida devem ser decompostas a moléculas individuais por enzimas extracelulares antes que possam ser sorvidas por células absorventes do revestimento do intestino.

Não obstante, a fagocitose é importante na maioria dos animais para outros propósitos diferentes da nutrição. **Células fagocitárias** – incluindo os

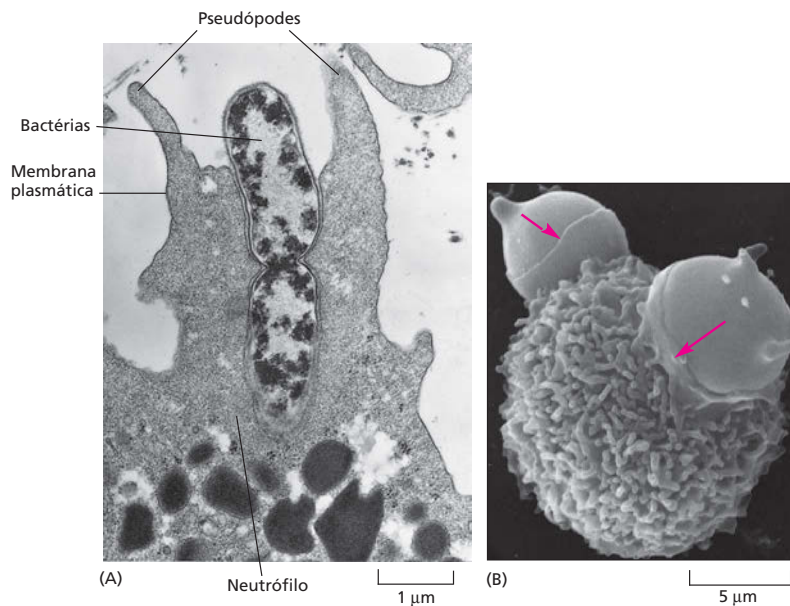



Figura 15-32 Uma célula fagocitária ingere outras células. (A) Microfotografia eletrônica de uma célula fagocitária branca do sangue (um neutrófilo) ingerindo uma bactéria, a qual está em processo de divisão. (B) Micrografia eletrônica de varredura mostrando um macrófago engolfando um par de eritrócitos. Os eritrócitos são deformados à medida que são comprimidos pelo macrófago. As *setas vermelhas* apontam para as extremidades das finas lâminas de membrana – chamados de pseudópodes – que as células fagocitárias estão estendendo como colarinhos para encobrir sua presa. (A, cortesia de Dorothy F. Bainton. B, cortesia de Jean Paul Revel.)

macrófagos, que estão amplamente distribuídos nos tecidos, e algumas outras células brancas do sangue – defendem-nos contra infecções pela ingestão de microrganismos invasores. Para serem capturadas por um macrófago ou outro leucócito, as partículas devem primeiro ligar-se à superfície da célula fagocitária e ativar um de uma variedade de receptores de superfície. Alguns desses receptores reconhecem anticorpos, as proteínas que nos protegem contra infecções por se ligarem à superfície dos microrganismos. A ligação de uma bactéria coberta por anticorpos a esses receptores induz a célula fagocitária a estender projeções da membrana plasmática, chamadas de *pseudópodes*, que engolfam a bactéria (**Figura 15-32A**) e se fusionam nas pontas para formar um fagossomo. O fagossomo então se fusiona com um lisossomo e o microrganismo é digerido. Algumas bactérias patogênicas desenvolveram artifícios para subverter o sistema: por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis,* o agente responsável pela tuberculose, pode inibir a fusão de membrana que une o fagossomo com o lisossomo. Em lugar de ser destruído, o organismo engolfado sobrevive e se multiplica dentro do macrófago. Como a bactéria realiza essa tarefa é ainda desconhecido.

Células fagocitárias também têm uma participação importante na limpeza de células mortas ou defeituosas e restos celulares. Macrófagos, por exemplo, ingerem mais de 10^{11} de nossas células vermelhas do sangue esgotadas todos os dias (Figura 15-32B).

Os líquidos e as macromoléculas são captados por pinocitose

As células eucarióticas continuamente ingerem pequenos pedaços de sua membrana plasmática, juntamente com pequenas quantidades de líquido extracelular, na forma de pequenas vesículas pinocíticas que são posteriormente retornadas à superfície celular. A velocidade com que a membrana plasmática é internalizada por **pinocitose** varia de tipo celular para tipo celular, mas é, em geral, surpreendentemente grande. Um macrófago, por exemplo, engole 25% do seu próprio volume de líquidos a cada hora. Isso significa que ele remove 3% de sua membrana plasmática a cada minuto, ou 100% em cerca de meia hora. Fibroblastos endocitam a uma taxa um pouco menor, ao passo que algumas amebas fagocitárias ingerem sua membrana plasmática ainda mais rapidamente. Uma vez que a área de superfície total e o volume de uma célula permanecem inalterados durante esse processo, a mesma quantidade de membrana é adicionada à superfície celular por fusão de vesículas (exocitose) e removida por endocitose.

A pinocitose é principalmente conduzida por fossas e vesículas cobertas por clatrina, que discutimos anteriormente (ver Figuras 15-19 e 15-20). Após se destacarem da membrana plasmática, vesículas cobertas de clatrina rapidamente perdem sua capa e se fusionam com um endossomo. O líquido extracelular fica preso na fossa revestida à medida que essa se invagina para formar uma vesícula coberta; desse modo, as substâncias dissolvidas no líquido extracelular são internalizadas e entregues aos endossomos. Essa entrada de líquido é geralmente balanceada pela perda de líquido durante a exocitose.

A endocitose mediada por receptores fornece uma rota específica dentro de células animais

A pinocitose, como recém-descrita, é indiscriminada. As vesículas endocíticas simplesmente prendem quaisquer moléculas que por acaso estão presentes no líquido extracelular e as carregam para dentro da célula. Na maioria das células animais, no entanto, a pinocitose por vesículas revestidas de clatrina também fornece uma via eficiente para captar macromoléculas específicas do líquido extracelular. As macromoléculas se ligam a receptores complementares na superfície celular e entram na célula como complexos de receptor-macromolécula em vesículas revestidas de clatrina. Esse processo, chamado de **endocitose mediada por receptor**, fornece um mecanismo de concentração seletiva que aumenta a eficiência de internalização de determinadas macromoléculas mais de 1.000 vezes comparado com o processo comum de pinocitose, de forma que até mesmo componentes menos abundantes do líquido extracelular podem ser absorvidos em quantidades sem arrebatar um grande volume correspondente de líquido extracelular. Um importante exemplo de pinocitose mediada por receptor é a habilidade das células animais de captar o colesterol de que elas necessitam para produzir membranas novas.

O colesterol é extremamente insolúvel e é transportado na corrente sanguínea ligado à proteína na forma de partículas chamadas de *lipoproteínas de baixa densidade* (*low-densitiy lipoproteins, LDL*). O LDL se liga a receptores localizados na superfície celular, e os complexos de receptor-LDL são ingeridos por endocitose mediada por receptor e entregue a endossomos. O interior dos endossomos é mais ácido do que o citosol circundante ou o líquido extracelular; e nesse ambiente ácido, o LDL se dissocia do seu receptor: os receptores são devolvidos em vesículas de transporte à membrana plasmática para serem reutilizados, e o LDL é entregue aos lisossomos. Nos lisossomos, o LDL é quebrado por enzimas hidrolíticas. O colesterol é liberado e escapa para dentro do citosol, onde está disponível para nova síntese de membranas. Os receptores de LDL na superfície celular são continuamente internalizados e reciclados, quer eles sejam ocupados por LDL ou não (**Figura 15-33**).

Essa via para captura de colesterol é rompida em indivíduos que herdaram um gene codificante da proteína receptora de colesterol defeituoso. Em alguns casos, os receptores não estão presentes; em outros, eles estão, mas não são funcionais. Em ambos os casos, como as células são deficientes em captar LDL, o colesterol se acumula no sangue e predispõe os indivíduos a desenvolverem aterosclerose. A não ser que tomem fármacos (estatinas) para reduzir o colesterol do sangue, provavelmente morrerão jovens de ataque cardíaco resultante de entupimento, por colesterol, das artérias que abastecem o coração.

A endocitose mediada por receptor é também usada para captar muitos outros metabólitos essenciais, como a vitamina B_{12} e o ferro, que as células não podem adquirir pelo processo de transporte pela membrana discutido no Capítulo 12. A vitamina B_{12} e o ferro são necessários, por exemplo, para a síntese de hemoglobina, que é a principal proteína em eritrócitos; esses metabólitos entram eritrócitos imaturos como um complexo com proteína. Muitos receptores da superfície celular que se ligam a moléculas sinalizadoras extracelulares são também ingeridos por essa via: alguns são reciclados à membrana plasmática para serem reutilizados, e outros são degradados em lisossomos. Desastrosamente, a endocitose mediada por receptor pode também ser explorada por vírus: o vírus influenza e o vírus do HIV, que causa a AIDS, entram na célula dessa maneira.

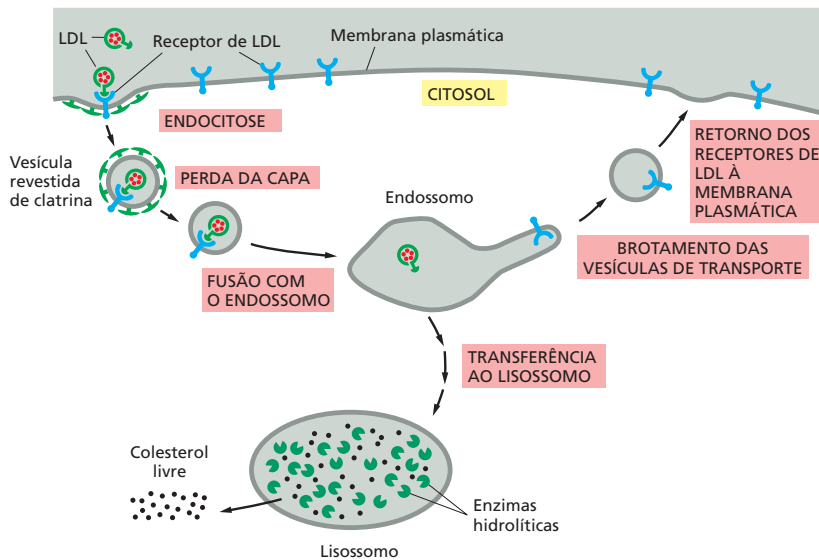



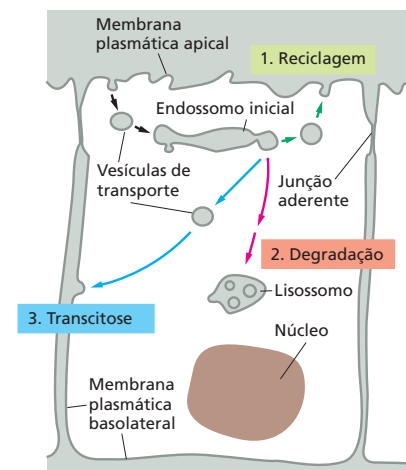
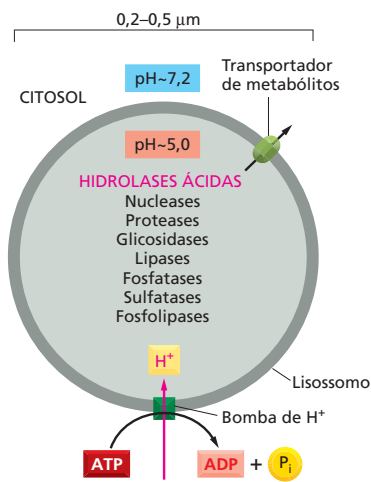
Figura 15-33 O LDL entra nas células pela endocitose mediada por receptor. O LDL se liga aos receptores na superfície da célula e é internalizado em vesículas revestidas de clatrina. As vesículas perdem sua capa e então se fusionam com os endossomos. No ambiente ácido dos endossomos, o LDL se dissocia de seus receptores. Enquanto o LDL acaba nos lisossomos, onde é degradado para liberar colesterol livre, os receptores de LDL são devolvidos à membrana plasmática pelas vesículas de transporte para serem usados novamente (**Animação 15.10**). Para simplificar, apenas um receptor de LDL é mostrado entrando na célula e retornando à membrana plasmática. Quer seja ocupado ou não, um receptor de LDL faz tipicamente uma viagem de ida e volta para dentro da célula e de volta a cada 10 minutos, fazendo um total de várias centenas de viagens em suas vinte horas de vida.

As macromoléculas endocitadas são distribuídas em endossomos

Uma vez que o material extracelular capturado por pinocitose é rapidamente transferido aos **endossomos**, é possível visualizar o compartimento endossômico pela incubação de células vivas em líquido contendo marcadores de alta densidade eletrônica que irão aparecer quando visualizados em um microscópio eletrônico. Quando examinado dessa forma, o compartimento endossômico se revela um complexo conjunto de tubos de membrana e de grandes vesículas conectados. Dois conjuntos de endossomos podem ser distinguidos em tais experimentos: as moléculas marcadas aparecem primeiro em *endossomos iniciais,* pouco abaixo da membrana plasmática; 5-15 minutos mais tarde eles aparecem em *endossomos tardios,* perto do núcleo (ver Figura 15-18). Endossomas iniciais amadurecem gradualmente em endossomos tardios à medida que se fusionam uns com os outros ou com endossomos tardios preexistentes (**Animação 15.11**). O interior do compartimento endossômico é mantido ácido (pH 5-6) por uma bomba de H^+ (prótons) dirigida por ATP na membrana endossômica que bombeia H^+ do citosol para dentro do lúmen endossômico.

O compartimento endossômico age como a principal estação de distribuição na via endocítica de entrada, da mesma forma que a rede *trans* de Golgi serve essa função na via secretória de saída. O ambiente ácido do endossomo desempenha uma parte crucial no processo de distribuição, levando muitos receptores a liberar sua carga ligada. Os rumos tomados pelos receptores, uma vez que tenham entrado em um endossomo, diferem de acordo com o tipo de receptor: (1) a maioria é devolvida ao mesmo domínio da membrana plasmática de onde vieram, como é o caso do receptor do LDL discutido anteriormente; (2) alguns se movem ao lisossomo, onde são degradados, e (3) alguns prosseguem para um domínio diferente da membrana plasmática, transferindo suas moléculas carga ligadas de um espaço extracelular para outro, um processo chamado de *transcitose* (**Figura 15-34**).

Figura 15-34 O destino das proteínas receptoras envolvidas na endocitose depende do tipo de receptor. Três vias a partir do compartimento endossômico em uma célula epitelial são mostradas. Receptores que não são especificamente recuperados de endossomos iniciais seguem a via a partir do compartimento endossômico para os lisossomos, onde são degradados. Receptores recuperados são devolvidos ou para o mesmo domínio da membrana plasmática de onde vieram *(reciclagem)* ou para um domínio diferente da membrana plasmática *(transcitose).* Se o ligante que é endocitado com seu receptor permanece ligado ao receptor no ambiente ácido do endossomo, ele seguirá a mesma via que o receptor; caso contrário ele será entregue aos lisossomos para degradação.

Figura 15-35 Um lisossomo contém enzimas hidrolíticas e uma bomba de H^+. As hidrolases ácidas são enzimas hidrolíticas que são ativas sob condições ácidas. O lúmen do lisossomo é mantido a um pH ácido por uma H^+ ATPase da membrana que bombeia H^+ para o lúmen.

QUESTÃO 15-8

O ferro (Fe) é um metal essencial necessário a todas as células. Ele é exigido, por exemplo, para a síntese de grupos heme que são parte do sítio ativo de muitas enzimas envolvidas nas reações de transferência de elétrons; ele é também necessário na hemoglobina, a principal proteína dos eritrócitos. O ferro é capturado pelas células pela endocitose mediada por receptor. O sistema de captação de ferro tem dois componentes, uma proteína solúvel denominada transferrina, que circula na corrente sanguínea, e um receptor de transferrina – uma proteína transmembrana que, como o receptor da LDL na Figura 15-33, é continuamente endocitada e reciclada na membrana plasmática. Íons de Fe se ligam à transferrina em um pH neutro, mas não em um pH ácido. A transferrina se liga ao receptor de transferrina em um pH neutro somente quando possui um íon Fe ligado, mas se liga ao receptor a um pH ácido mesmo na ausência de ferro ligado. A partir dessas propriedades, descreva como o ferro é capturado e discuta as vantagens desse esquema elaborado.

As moléculas carga que permanecem ligadas aos seus receptores compartilham o destino dos mesmos. Aquelas que se dissociam dos seus receptores no endossomo estão destinadas à destruição nos lisossomos, junto com a maior parte do conteúdo do lúmen do endossomo. Endossomos tardios contêm algumas enzimas lisossomais; assim, a digestão de proteínas carga e outras macromoléculas inicia no endossomo e continua à medida que o endossomo gradualmente sofre maturação em lisossomo.

Os lisossomos são os principais sítios de digestão intracelular

Muitas partículas extracelulares e moléculas ingeridas pelas células acabam em **lisossomos**, os quais são sacos membranosos de enzimas hidrolíticas que conduzem a digestão intracelular controlada de materiais extracelulares e organelas esgotadas. Eles contêm cerca de 40 tipos de enzimas hidrolíticas, incluindo aquelas que degradam proteínas, ácidos nucleicos, oligossacarídeos e fosfolipídeos. Todas essas enzimas são otimamente ativas nas condições ácidas (pH ~5) mantidas dentro dos lisossomos. A membrana do lisossomo normalmente mantém essas enzimas destrutivas fora do citosol (cujo pH é em torno de 7,2), mas a dependência de um pH ácido dessas enzimas protege o conteúdo do citosol contra danos, ainda que algum vazamento ocorra.

Como todas as outras organelas intracelulares, o lisossomo não apenas contém uma coleção única de enzimas, mas também possui uma membrana única circundante. A membrana lisossômica contém transportadores que permitem que os produtos finais da digestão de macromoléculas, como aminoácidos, açúcares e nucleotídeos, sejam transportados ao citosol; de onde eles podem ser excretados ou utilizados pela célula. A membrana também contém uma bomba de H^+ dirigida por ATP, a qual, como na membrana endossômica, bombeia H^+ para dentro dos lisossomos, mantendo, dessa forma, seu conteúdo em um pH ácido (**Figura 15-35**). A maioria das proteínas da membrana lisossômica é bastante glicosilada de forma singular; os açúcares, que cobrem muito da superfície das proteínas revestindo o lúmen, protegem as proteínas da digestão pelas proteases lisossômicas.

Enzimas digestórias especializadas e proteínas de membrana do lisossomo são sintetizadas no RE e transportadas pelo aparelho de Golgi para a rede *trans* de Golgi. Enquanto no RE e na rede *cis* de Golgi, as enzimas são etiquetadas com um grupo de açúcares fosforilado específico (manose 6-fosfato), de forma que, quando elas chegam na rede *trans* de Golgi, são reconhecidas por um receptor apropriado –, o receptor da manose 6-fosfato. Essa etiquetagem permite que as enzimas sejam distribuídas e empacotadas em vesículas de transporte, as quais se destacam e entregam seu conteúdo aos lisossomos por endossomos tardios (ver Figura 15-18).

Dependendo da sua fonte, os materiais seguem diferentes rotas para o lisossomo. Vimos que partículas extracelulares são capturadas em fagossomos, os quais se fusionam com lisossomos, e que os líquidos extracelulares e as macromoléculas são capturados em vesículas endocíticas menores, que entregam seu conteúdo aos lisossomos por meio de endossomos. Contudo, as células possuem uma via adicional para suprir materiais ao lisossomo; essa via, chamada de *autofagia*, é usada para a degradação de partes obsoletas da própria célula. Em microfotografias eletrônicas de células hepáticas, por exemplo, frequentemente são vistos lisossomos digerindo mitocôndria, assim como outras organelas. O processo inicia com o cerco da organela por uma membrana dupla, criando um *autofagossomo,* o qual então, se fusiona com lisossomos (**Figura 15-36**). Não é conhecido o que marca uma organela para tal destruição.

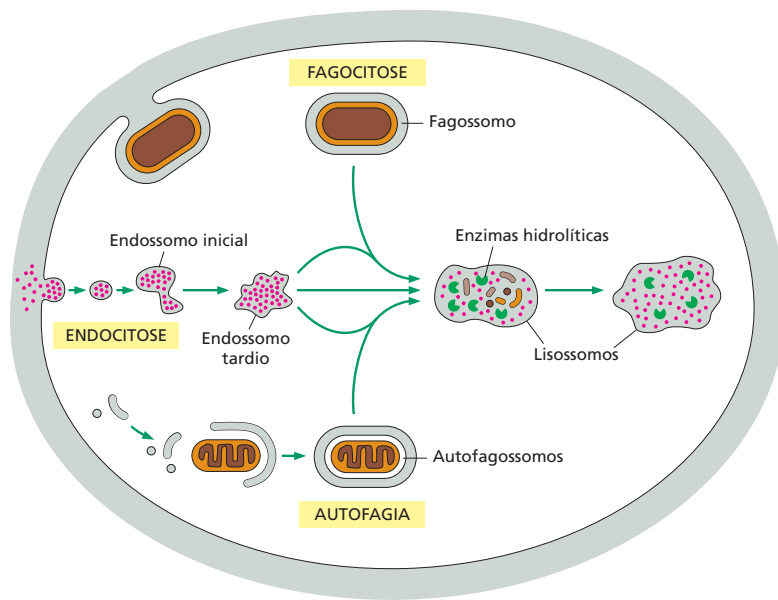



Figura 15-36 Materiais destinados à degradação seguem diferentes vias para os lisossomos. Cada via leva à digestão intracelular de materiais derivados de fontes diferentes. Essas organelas podem fusionar-se com lisossomos (ou endossomos tardios), que contêm enzimas hidrolíticas que digerem seu conteúdo. Entretanto, eles diferem dos lisossomos "clássicos" apenas em função dos diferentes materiais que estão digerindo.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- As células eucarióticas contêm muitas organelas envoltas por membranas, incluindo um núcleo, um retículo endoplasmático (RE), um aparelho de Golgi, lisossomos, endossomos, mitocôndrias, cloroplastos (em células vegetais) e peroxissomos.
- A maioria das proteínas das organelas é produzida no citosol e transportada para a organela onde ela deve atuar. Os sinais de distribuição na sequência de aminoácidos guiam as proteínas à organela correta; proteínas que funcionam no citosol não possuem sinal e permanecem onde elas são feitas.
- As proteínas nucleares contêm sinais de localização nuclear que as ajudam a direcionar seu transporte ativo do citosol para dentro do núcleo pelos poros nucleares, os quais penetram o envelope nuclear de membrana dupla. As proteínas podem entrar no núcleo sem serem desenoveladas.
- A maioria das proteínas de mitocôndrias e cloroplastos é produzida no citosol e é então ativamente transportada para dentro das organelas por translocadores proteicos nas suas membranas. As proteínas devem ser desenoveladas para que possam serpentear pelas membranas mitocondriais e cloroplásticas.
- O RE é a fábrica de membranas da célula; ele produz a maioria dos lipídeos e muitas das proteínas da célula. As proteínas são produzidas por ribossomos ligados à superfície do RE rugoso.
- Os ribossomos do citosol são direcionados ao RE se a proteína que estão produzindo possui uma sequência-sinal para o RE, a qual é reconhecida por uma partícula de reconhecimento de sinal (SRP) no citosol; a ligação do complexo ribossomo-SRP ao receptor na membrana do RE inicia o processo de translocação que introduz o polipeptídeo crescente de um lado ao outro da membrana do RE por um canal de translocação.
- As proteínas solúveis destinadas à secreção ou ao lúmen de uma organela passam completamente para dentro do lúmen do RE, e as proteínas transmembrana destinadas à membrana do RE ou a outra membrana celular permanecem ancoradas na bicamada lipídica por um ou mais segmentos α-helicoidais de distribuição na membrana.

- No lúmen do RE, as proteínas dobram-se, agregam-se com outras proteínas, formam pontes dissulfito e tornam-se decoradas com cadeias oligossacarídicas.
- A saída do RE é uma importante etapa de controle da qualidade; as proteínas que falham em enovelar-se apropriadamente ou falham em agregar-se aos seus parceiros normais são retidas no RE e, finalmente, são degradadas.
- Um acúmulo de proteínas malenoveladas aciona uma resposta que expande o tamanho do RE, aumentando, assim, sua capacidade de enovelar novas proteínas apropriadamente.
- O transporte proteico do RE ao aparelho de Golgi e do aparelho de Golgi a outros destinos é mediado por vesículas de transporte que continuamente se destacam de uma membrana e se fusionam com outra; um processo chamado de transporte vesicular.
- As vesículas de transporte em brotamento têm distintas proteínas de capa na sua superfície citosólica; a montagem da capa conduz o processo de brotamento, e as proteínas da capa ajudam a incorporar os receptores com suas moléculas carga dentro das vesículas em formação.
- As vesículas revestidas perdem suas proteínas da capa logo após se destacarem, permitindo que se ancorem e se fusionem com uma membrana-alvo em particular; o ancoramento e a fusão são mediados por proteínas nas vesículas e nas membranas-alvo, incluindo proteínas Rab e SNAREs.
- O aparelho de Golgi recebe proteínas recém-sintetizadas do RE; ele modifica os seus oligossacarídeos, distribui as proteínas e as despacha da rede *trans* de Golgi para a membrana plasmática, lisossomos ou vesículas secretórias.
- Em todas as células eucarióticas, vesículas de transporte brotam continuamente da rede *trans* de Golgi e se fusionam com a membrana plasmática, um processo chamado de exocitose constitutiva; o processo entrega lipídeos e proteínas da membrana plasmática, além de liberar moléculas da célula, um processo chamado de secreção.
- Células secretórias especializadas também possuem uma via regulada de exocitose, onde moléculas armazenadas em vesículas secretórias são liberadas da célula por exocitose quando a célula recebe um sinal para secretar.
- As células ingerem líquidos, moléculas e, algumas vezes, partículas, por endocitose, na qual regiões da membrana plasmática se invaginam e se destacam para formar vesículas endocíticas.
- Muito do material endocitado é entregue aos endossomos e então aos lisossomos, onde é degradado por enzimas hidrolíticas; a maioria dos componentes da membrana da vesícula endocítica, no entanto, é reciclada em vesículas de transporte de volta à membrana plasmática para ser reutilizada.

TERMOS-CHAVE

clatrina
vesícula revestida
citosol
endocitose
retículo endoplasmático (RE)
endossomo
exocitose
aparelho de golgi
lisossomo
organelas envoltas por membranas
envelope nuclear
poro nuclear
peroxissomo
célula fagocitária
fagocitose
pinocitose
proteína Rab
endocitose mediada por receptor
retículo endoplasmático rugoso
secreção
vesícula secretória
sequência-sinal
SNARE
vesícula de transporte
resposta de proteína desenovelada (UPR)
transporte vesicular

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 15-9

Quais das afirmações a seguir são corretas? Explique suas respostas.

A. Os ribossomos são estruturas citoplasmáticas que, durante a síntese proteica, tornam-se unidos por uma molécula de mRNA para formar polirribossomos.

B. A sequência de aminoácidos Leu-His-Arg-Leu-Asp-Ala-Gln -Ser-Lys-Leu-Ser-Ser é uma sequência-sinal que direciona as proteínas ao RE.

C. Todas as vesículas de transporte na célula devem possuir uma proteína v-SNARE na sua membrana.

D. As vesículas de transporte entregam proteínas e lipídeos à superfície celular.

E. Se a entrega de proteínas lisossômicas da rede *trans* de Golgi aos endossomos tardios fosse bloqueada, as proteínas lisossômicas seriam secretadas pela via secretória constitutiva mostrada na Figura 15-27.

F. Os lisossomos digerem apenas substâncias que foram capturadas pela célula por endocitose.

G. As cadeias de açúcares *N*-ligadas são observadas em glicoproteínas que se voltam para a superfície celular, assim como em glicoproteínas que se orientam para o lúmen do RE, da rede *trans* de Golgi e da mitocôndria.

QUESTÃO 15-10

Algumas proteínas vão e voltam entre o núcleo e o citosol. Elas necessitam de sinal de exportação nuclear para sair do núcleo. Como você supõe que essas proteínas entram no núcleo?

QUESTÃO 15-11

Os vírus influenza são circundados por uma membrana que contém uma proteína de fusão, que é ativada em pH ácido. Quando ativada, a proteína causa a fusão da membrana viral com as membranas celulares. Um velho remédio popular contra a gripe recomenda que se passe a noite em um estábulo de cavalos. Ainda que pareça bizarro, há uma explicação racional para esse conselho. O ar em estábulos contém amônia (NH_3) gerada por bactérias na urina dos cavalos. Esboce um esquema mostrando a via (em detalhe) pela qual o vírus influenza entra nas células, e especule sobre como NH_3 pode proteger as células da infecção por vírus. (Pista: NH_3 pode neutralizar soluções ácidas pela reação $NH_3 + H^+ \rightarrow NH_4^+$.)

QUESTÃO 15-12

Considere a v-SNARE que direciona as vesículas de transporte da rede *trans* de Golgi à membrana plasmática. Elas, como todas as outras v-SNAREs, são proteínas transmembrana integradas na membrana do RE durante sua biossíntese e são, então, levadas por vesículas de transporte ao seu destino. Dessa forma, as vesículas de transporte brotando do RE contêm pelo menos dois tipos de v-SNAREs – aquelas que sinalizam as vesículas às cisternas *cis* de Golgi e aquelas que estão em trânsito para a rede *trans* de Golgi para serem empacotadas em diferentes vesículas de transporte destinadas à membrana plasmática. (A) Por que isso poderia ser um problema? (B) Sugira possíveis meios para a célula resolver esse problema.

QUESTÃO 15-13

Um tipo particular de mutante de *Drosophila* se torna paralisado quando há um aumento de temperatura. A mutação afeta a estrutura da dinamina, causando a sua inativação com o aumento da temperatura. De fato, a função da dinamina foi descoberta pela análise dos defeitos dessas moscas-das-frutas mutantes. A paralisia completa à temperatura elevada sugere que a transmissão sináptica entre o nervo e as células do músculo (discutida no Capítulo 12) está bloqueada. Sugira por que a transmissão sináptica na sinapse deve requerer dinamina. Com base na sua hipótese, o que você esperaria ver em microfotografias eletrônicas das sinapses das moscas que são expostas a temperaturas elevadas?

QUESTÃO 15-14

Revise as afirmações seguintes, se necessário, para torná-las verdadeiras: "Uma vez que as sequências de localização nuclear não são clivadas por proteases após a importação da proteína pelo núcleo, elas podem ser reutilizadas para importar as proteínas nucleares após a mitose, quando as proteínas citosólicas e nucleares tiverem se misturado. Isso está em contraste com as sequências-sinal para o RE, as quais são clivadas por uma peptidase-sinal assim que atingem o lúmen do RE. As sequências-sinal do RE não podem, portanto, ser reutilizadas para importar proteínas do RE após a mitose, quando as proteínas citosólicas e de RE tenham se misturado; essas proteínas do RE devem, portanto, ser degradadas e ressintetizadas".

QUESTÃO 15-15

Considere uma proteína que contém uma sequência-sinal para o RE em sua porção N-terminal e uma sequência de localização nuclear no meio. Qual você pensa que seria o destino dessa proteína? Explique sua resposta.

QUESTÃO 15-16

Compare e contraste a importação de proteínas para dentro do RE e para dentro de núcleo. Liste pelo menos duas diferenças principais desses mecanismos e especule por que o mecanismo do RE não deve funcionar para a importação nuclear e vice-versa.

QUESTÃO 15-17

Durante a mitose, o envelope nuclear se quebra em pequenas vesículas e as proteínas nucleares se misturam completamente com as proteínas citosólicas. Isso está de acordo com o esquema evolutivo proposto na Figura 15-3?

QUESTÃO 15-18

Uma proteína que inibe certas enzimas proteolíticas (proteases) é normalmente secretada na corrente sanguínea pelas células hepáticas. Essa proteína inibitória, a antitripsina, está ausente na corrente sanguínea de pacientes que trazem uma mutação que resulta na alteração de um único aminoácido na proteína. A deficiência em antitripsina causa uma variedade de problemas graves, particularmente no tecido pulmonar, em função da atividade descontrolada das proteases. Surpreendentemente, quando a antitripsina mutante é sintetizada no laboratório, ela é ativa como a antitripsina normal em inibir proteases. Por que, então, a mutação causa a doença? Pense em mais de uma possibilidade e sugira maneiras pelas quais você poderia distinguir entre elas.

QUESTÃO 15-19

A Dra. Outonalimb's reivindica para si a descoberta do "esquecendo", uma proteína predominantemente produzida pela glândula pineal em adolescentes humanos. A proteína causa indiferença e perda de memória de curto prazo quando o sistema auditivo recebe afirmações como "Por favor, leve o lixo!". Sua hipótese é a de que "esquecendo" possui uma sequência-sinal de RE hidrofóbica em sua porção C-terminal que é reconhecida por um SRP e causa a translocação pela membrana do RE pelo mecanismo mostrado na Figura 15-14. Ela prevê que a proteína é secretada das células pineal para a corrente sanguínea, de onde ela exerce seus efeitos sistêmicos devastadores. Você é membro de um comitê decidindo se ela deve receber fundos para trabalhos futuros na sua hipótese. Critique sua proposta e considere que revisões de fundos devem ser educadas e construtivas.

QUESTÃO 15-20

Dando um passo à frente em relação ao esquema evolutivo da Figura 15-3, sugira como o aparelho de Golgi pode ter evoluído. Faça um esboço simples para ilustrar as suas ideias. Para o aparelho de Golgi ser funcional, o que mais deveria ter evoluído?

QUESTÃO 15-21

Se as proteínas de membrana são integradas na membrana do RE por meio do canal de translocação de proteínas do RE (o qual é, por sua vez, também composto de proteínas), como os primeiros canais de translocação de proteínas se tornaram incorporados na membrana do RE?

QUESTÃO 15-22

O esboço da **Figura Q15-22** é um desenho esquemático de uma microfotografia eletrônica mostrada no terceiro painel da Figura 15-19A. Nomeie as estruturas que estão marcadas no esboço.

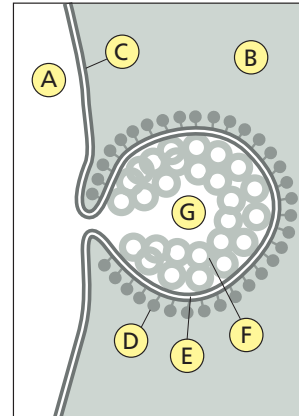
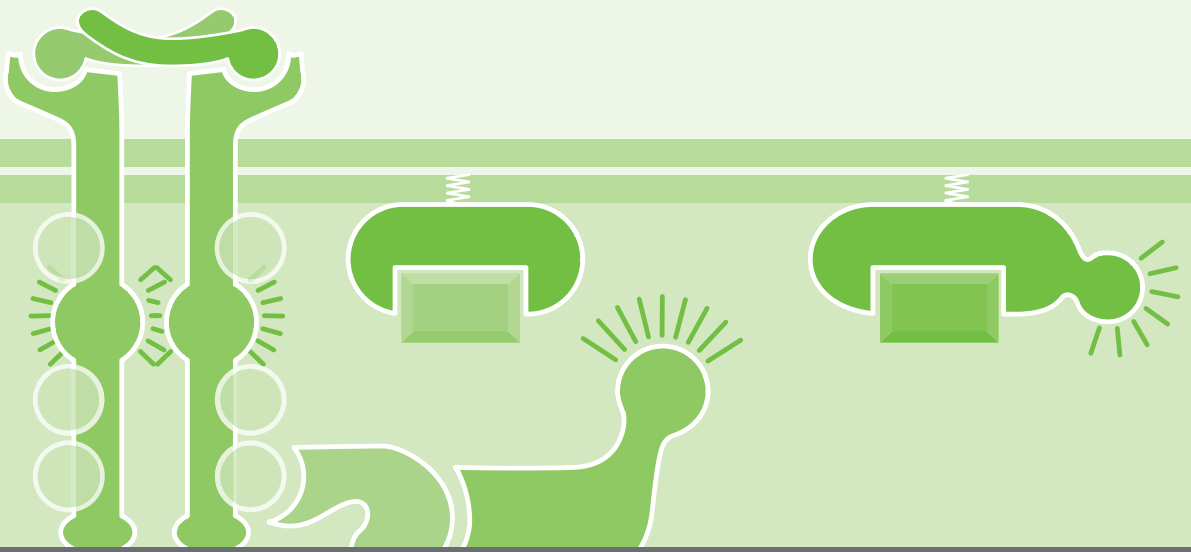



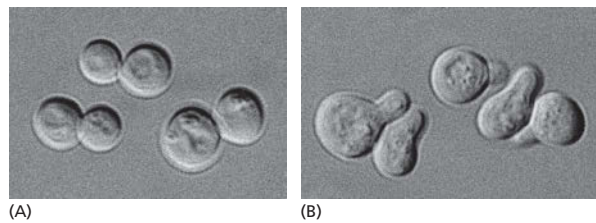
Figura Q15-22

CAPÍTULO 16

Comunicação Celular

As células individuais, assim como os organismos multicelulares, precisam sentir e responder ao seu ambiente. Uma célula de vida livre – mesmo uma bactéria primitiva – deve ser capaz de farejar nutrientes, perceber a diferença entre claro e escuro e evitar venenos e predadores. Se essa célula tiver algum tipo de "vida social", ela deve ser capaz de se comunicar com outras células. Quando uma célula de levedura está pronta para acasalar, por exemplo, ela secreta uma pequena proteína chamada de fator de acasalamento. As leveduras do "sexo" oposto detectam esse chamado químico de acasalamento e respondem interrompendo o progresso no ciclo celular e emitindo protrusões na direção da célula que emitiu o sinal (**Figura 16-1**).

Em um organismo multicelular, as coisas são muito mais complicadas. As células têm de interpretar a multiplicidade de sinais que recebem de outras células para auxiliar na coordenação de seu comportamento. Durante o desenvolvimento animal, por exemplo, as células do embrião trocam sinais para determinar qual função especializada cada célula deverá adotar, que posição ela deverá ocupar no animal e se deverá sobreviver, dividir-se ou morrer; posteriormente, uma variedade de sinais coordena o crescimento do animal, assim como sua fisiologia e comportamento cotidiano. Nas plantas, as células também estão em comunicação constante umas com as outras. Suas interações permitem à planta responder às condições de luz, à escuridão e à temperatura, que orientam os ciclos do seu crescimento, florescimento e frutificação, e coordenar o que acontece nas raízes, nos ramos e nas folhas.

Neste capítulo, examinaremos alguns dos meios mais importantes de comunicação entre as células e discutiremos como elas enviam sinais e como interpretam os que recebem. Apesar de nos concentrarmos nos mecanismos de recepção e de interpretação de sinais nas células animais, apresentaremos também uma breve revisão do que se sabe sobre vias de sinalização em células vegetais. Iniciaremos nossa discussão com um resumo dos princípios gerais da si-

Figura 16-1 Células de levedura respondem ao fator de acasalamento. Células de levedura de brotamento *(Saccharomyces cerevisiae)* são normalmente esféricas (A), mas quando são expostas ao fator de acasalamento produzido pelas células vizinhas formam protrusões na direção da fonte do fator (B). As células que adotam essa forma em resposta ao sinal de acasalamento são chamadas *shmoos* em uma alusão ao personagem do desenho animado da década de 1940, criado por Al Capp. (Cortesia de Michael Snyder.)

nalização celular e estudaremos a seguir dois dos principais sistemas utilizados pelas células animais para receber e interpretar sinais.

PRINCÍPIOS GERAIS DA SINALIZAÇÃO CELULAR

A informação pode vir sob várias formas, e a comunicação envolve, frequentemente, a conversão dos sinais de informação de uma forma para outra. Quando você recebe uma chamada de um amigo em seu telefone celular, por exemplo, o telefone converte os sinais de rádio que viajam pelo ar em ondas sonoras que você ouve. Os pontos críticos nessa transmissão ocorrem onde a mensagem é convertida de uma forma para outra. Esse processo de conversão é denominado **transdução de sinal** (Figura 16-2).

Os sinais que transitam entre as células são muito mais simples do que as mensagens trocadas pelos seres humanos. Em uma comunicação característica entre células, a *célula sinalizadora* produz um tipo particular de *molécula-sinal* que é detectada pela *célula-alvo.* Assim como na conversação humana, a maioria das células animais envia e recebe sinais, e, portanto, podem atuar tanto como células sinalizadoras como receptoras. As células-alvo possuem *proteínas receptoras* que reconhecem e respondem especificamente à molécula-sinal. A transdução de sinal começa quando a proteína receptora na célula-alvo recebe um sinal extracelular e o converte nos sinais intracelulares que alteram o comportamento celular. A maior parte deste capítulo tratará da recepção e da transdução de sinal – os eventos que os biólogos celulares têm em mente quando se referem à **sinalização celular**. Primeiramente, contudo, veremos de forma sucinta os diferentes tipos de sinais que as células enviam umas às outras.

Os sinais podem atuar a distâncias curtas e longas

As células dos organismos multicelulares usam centenas de tipos de moléculas extracelulares para enviar sinais umas às outras. As moléculas-sinal podem ser proteínas, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, esteroides, derivados de ácidos graxos e até mesmo gases dissolvidos – mas contam com somente um punhado de tipos básicos de comunicação para transmitir as mensagens.

Nos organismos pluricelulares, o tipo mais "popular" de comunicação envolve a transmissão do sinal por todo o corpo pela secreção na corrente sanguínea (nos animais) ou na seiva (nas plantas). As moléculas-sinal usadas dessa forma são chamadas de **hormônios**, e nos animais, as células que os produzem são chamadas de células *endócrinas* (Figura 16-3A). Por exemplo, parte do pân-

Figura 16-2 Transdução de sinal é o processo pelo qual um tipo de sinal é convertido em outro. (A) Um telefone celular converte um sinal de rádio em um sinal sonoro quando o recebe (e vice-versa, quando o transmite). (B) Uma célula-alvo converte um sinal extracelular (molécula A) em um sinal intracelular (molécula B).

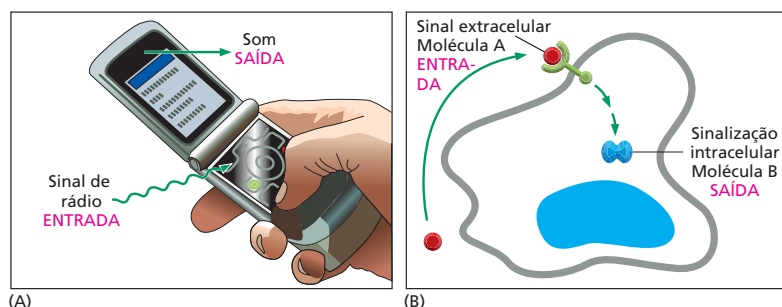
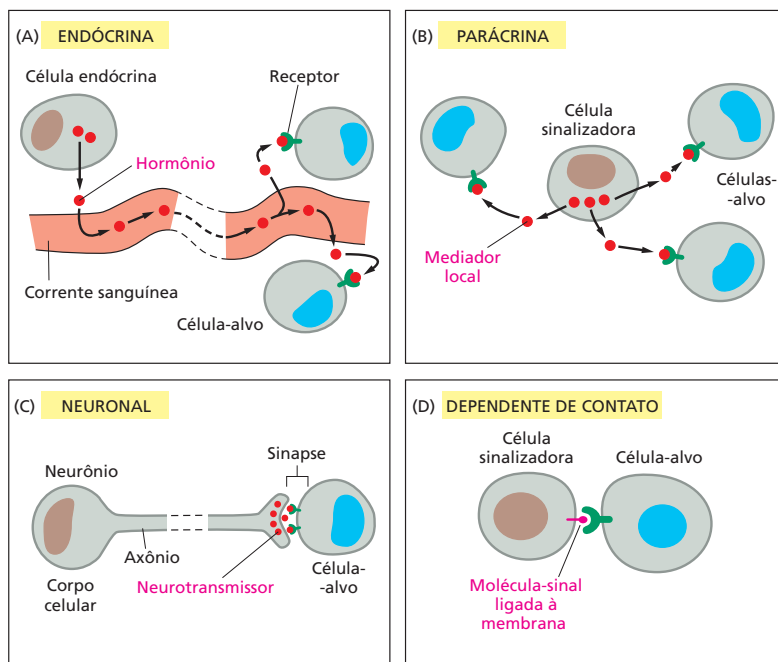



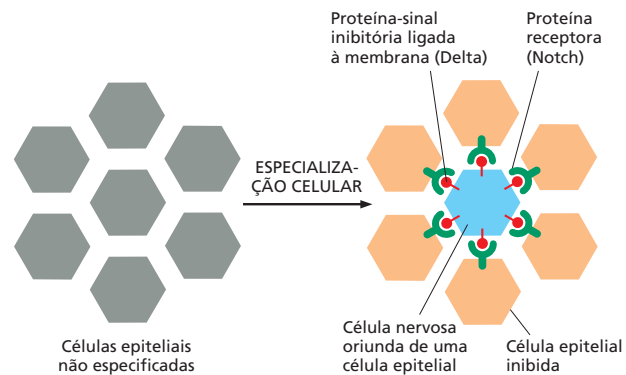
Figura 16-3 As células animais sinalizam de várias maneiras uma para outra. (A) Os hormônios produzidos em glândulas endócrinas são secretados para a corrente sanguínea e são amplamente distribuídos para todo o corpo. (B) Os sinais parácrinos são liberados pelas células para o meio extracelular nas suas vizinhanças e agem localmente. (C) Os sinais neuronais são transmitidos ao longo dos axônios para células-alvo distantes. (D) As células que mantêm uma interface íntima membrana-membrana podem se engajar na sinalização dependente de contato. Muitas moléculas-sinal do mesmo tipo são usadas na sinalização endócrina, parácrina e neuronal. As diferenças cruciais estão na velocidade e na seletividade com que os sinais são enviados aos seus alvos.

creas é uma glândula endócrina que produz o hormônio insulina, o qual regula a captação da glicose em todas as células do corpo.

Um pouco menos popular é o processo conhecido como *sinalização parácrina.* Nesse caso, em vez de entrar na corrente sanguínea, as moléculas-sinal se difundem localmente pelo líquido extracelular, permanecendo nas vizinhanças da célula que as secretou. Assim, elas atuam como **mediadores locais** sobre as células próximas (Figura 16-3B). Muitas das moléculas-sinal que regulam uma inflamação nos locais de infecção ou controlam a proliferação celular na cicatrização de um ferimento funcionam dessa maneira. Em alguns casos, as células podem responder aos mediadores que elas mesmas produzem, consistindo em uma forma de comunicação parácrina chamada de *sinalização autócrina;* as células cancerígenas às vezes promovem, dessa forma, sua própria sobrevivência ou proliferação.

A *sinalização neuronal* constitui uma terceira forma de comunicação celular. Assim como as células endócrinas, as células nervosas (neurônios) podem enviar mensagens a grandes distâncias. Contudo, no caso da sinalização neuronal, a mensagem não é amplamente distribuída, mas é liberada rápida e especificamente para as células-alvo individuais pelas vias privadas. Conforme descrito no Capítulo 12, o axônio de um neurônio termina em junções especializadas *(sinapses)* nas células-alvo, que podem estar longe do corpo celular neuronal (Figura 16-3C). Os axônios que se estendem desde a medula espinal ao dedão do pé, por exemplo, podem ter mais de 1 m de comprimento. Quando ativado por sinais provenientes do ambiente ou de outras células nervosas, o neurônio envia impulsos elétricos que correm ao longo do seu axônio a velocidades de até 100 m/s. Ao chegar ao terminal axonal, esses sinais elétricos são convertidos em uma forma química: cada impulso elétrico estimula a liberação, pelo terminal nervoso, de um pulso de uma *molécula-sinal extracelular* chamada de **neurotransmissor**. Esses neurotransmissores se difundem, em menos de 1 ms, pelo espaço estreito (< 100 nm) existente entre a membrana do terminal axonal e a membrana da célula-alvo.

Um quarto estilo de comunicação célula-célula mediada por sinal – a mais íntima e de mais curto alcance – não requer a liberação de uma molécula secretada. As células fazem contato direto por meio de moléculas-sinal localizadas na membrana plasmática das células sinalizadoras e proteínas receptoras inseri-

Figura 16-4 Sinalização dependente de contato controla a criação das células nervosas na *Drosophila*. O sistema nervoso da mosca-das-frutas se origina no embrião a partir de uma camada de células epiteliais. Determinadas células nessa camada começam a se especializar em neurônios, ao passo que suas vizinhas permanecem não neuronais e mantêm a estrutura epitelial da camada. Os sinais que controlam esse processo são transmitidos por contato direto célula-célula: cada futuro neurônio libera um sinal inibitório às células que estão em contato com ele, impedindo que elas também se especializem em neurônios. A molécula-sinal (Delta, neste caso) e a molécula receptora (chamada de Notch) são proteínas transmembrana. O mesmo mecanismo mediado pelas mesmas moléculas controla o padrão detalhado de tipos celulares diferenciados em vários outros tecidos, tanto em vertebrados como em invertebrados. Em moscas mutantes nas quais o mecanismo falha, alguns tipos celulares (como os neurônios) são produzidos em grande excesso à custa de outros.

das na membrana plasmática da célula-alvo (Figura 16-3D). No desenvolvimento embrionário, por exemplo, essa *sinalização dependente de contato* permite que as células adjacentes inicialmente iguais se tornem especializadas para formar tipos celulares diferentes (**Figura 16-4**).

Para relacionar esses diferentes estilos de sinalização, imagine fazer propaganda de uma conferência potencialmente estimulante – ou um concerto ou um jogo de futebol. Um sinal endócrino seria semelhante à transmissão da informação por uma estação de rádio. Um panfleto afixado em um quadro de avisos seria o equivalente a um sinal parácrino localizado. Os sinais neuronais – de longa distância, mas pessoais – seriam similares a uma chamada telefônica ou uma mensagem eletrônica, e a sinalização dependente de contato seria como uma boa e antiga conversa face a face. Na sinalização autócrina, você poderia escrever um recado para lembrá-lo de comparecer.

Na **Tabela 16-1**, estão listados alguns exemplos de hormônios, mediadores locais, neurotransmissores e moléculas de sinalização dependente de contato. Os efeitos de várias dessas moléculas serão discutidos em mais detalhes adiante neste capítulo.

QUESTÃO 16-1

Para que se mantenham como estímulo local, as moléculas-sinal parácrinas devem ser impedidas de se afastar para muito longe de seus pontos de origem. Sugira diferentes formas pelas quais isso pode ser obtido. Explique suas respostas.

Cada célula responde a um conjunto limitado de sinais, dependendo do seu histórico e do seu estado atual

Uma célula típica de um organismo multicelular está exposta a centenas de moléculas-sinal diferentes em seu ambiente. Essas podem estar livres no líquido extracelular, inseridas na matriz extracelular, onde as células estão apoiadas, ou ligadas na superfície das células vizinhas. Cada célula deve responder seletivamente a essa mistura de sinais, desprezando alguns e reagindo com outros, de acordo com sua função especializada.

A resposta de uma célula a uma molécula-sinal depende, antes de tudo, do fato de a célula possuir uma **proteína receptora**, ou um **receptor**, para essa molécula. Cada receptor é geralmente ativado por apenas um tipo de sinal. Sem o receptor apropriado, a célula será insensível ao sinal e não poderá reagir. Ao produzir somente um pequeno conjunto de receptores entre milhares possíveis, a célula restringe a gama de sinais que pode afetá-la.

Naturalmente, um pequeno número de moléculas-sinal extracelulares pode alterar o comportamento da célula-alvo de muitas maneiras diferentes. Elas podem alterar a forma da célula, o movimento, o metabolismo, a expressão gênica ou algumas combinações desses. Como veremos, o sinal de um receptor de superfície celular é normalmente propagado para o interior da célula-alvo por meio de um conjunto de *moléculas sinalizadoras intracelulares* que atuam em sequência e basicamente alteram a atividade de *proteínas efetoras* que afetam o comportamento da célula. Esse sistema de propagação intracelular e as proteínas efetoras sobre as quais ele atua variam de um tipo celular especializado para outro, de modo que células diferentes respondem de modo diferente ao mesmo tipo de sinal. Por exemplo, quando a célula muscular cardíaca é ex-

TABELA 16-1 Alguns exemplos de moléculas-sinal

Molécula sinalizadora	Local de origem	Natureza química	Algumas ações
Hormônios			
Adrenalina (epinefrina)	Glândula adrenal	Derivado do aminoácido tirosina	Aumenta a pressão arterial, o ritmo cardíaco e o metabolismo
Cortisol	Glândula adrenal	Esteroide (derivado do colesterol)	Afeta o metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos na maioria dos tecidos
Estradiol	Ovário	Esteroide (derivado do colesterol)	Induz e mantém as características sexuais secundárias femininas
Glucagon	Células α do pâncreas	Peptídeo	Estimula a síntese de glicose, a degradação de glicogênio e de lipídeos, por exemplo, nas células hepáticas e adiposas
Insulina	Células β do pâncreas	Proteína	Estimula a captação de glicose, a síntese de proteínas e de lipídeos, por exemplo, nas células hepáticas
Testosterona	Testículos	Esteroide (derivado do colesterol)	Induz e mantém as características sexuais secundárias masculinas
Hormônio da tireoide (tiroxina)	Glândula tireoide	Derivado do aminoácido tirosina	Estimula o metabolismo em muitos tipos celulares
Mediadores locais			
Fator de crescimento da epiderme (EGF)	Várias células	Proteína	Estimula a proliferação de células epidérmicas e de muitos outros tipos celulares
Fator de crescimento de plaquetas (PDGF)	Várias células, incluindo as plaquetas sanguíneas	Proteína	Estimula a proliferação de muitos tipos celulares
Fator de crescimento de nervo (NGF)	Vários tecidos inervados	Proteína	Promove a sobrevivência de certas classes de neurônios; promove o crescimento de seus axônios
Fator de crescimento e transformação β (TGF-β)	Muitos tipos celulares	Proteína	Inibe a proliferação celular, estimula a produção da matriz extracelular
Histamina	Mastócitos	Derivado do aminoácido histidina	Promove dilatação dos vasos sanguíneos tornando-os permeáveis, auxiliando na inflamação
Óxido nítrico (NO)	Células nervosas, células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos	Gás dissolvido	Causa relaxamento da musculatura lisa; regula a atividade das células nervosas
Neurotransmissores			
Acetilcolina	Terminais nervosos	Derivado da colina	Neurotransmissor excitatório em muitas sinapses neuromusculares e no sistema nervoso central
Ácido γ-aminobutírico (GABA)	Terminais nervosos	Derivado do aminoácido ácido glutâmico	Neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central
Moléculas-sinal dependentes de contato			
Delta	Neurônios potenciais; vários outros tipos celulares embrionários	Proteína transmembrana	Impede células vizinhas de se tornarem especializadas como a célula sinalizadora

posta ao neurotransmissor *acetilcolina,* a frequência e a força das contrações diminuem. Quando uma glândula salivar é exposta ao mesmo sinal, ela secreta componentes da saliva, mesmo que os receptores sejam os mesmos em ambos os tipos celulares. No músculo esquelético, a acetilcolina se liga a uma proteína receptora diferente e provoca a contração muscular (**Figura16-5**). Dessa forma, a molécula-sinal extracelular sozinha não é a mensagem: a informação transmitida pelo sinal depende de como a célula-alvo recebe e interpreta o sinal.

Uma célula típica possui muitos tipos de receptores, cada um presente em dezenas a centenas de milhares de cópias. Tal variedade torna a célula sensível simultaneamente a muitos sinais extracelulares e permite que um número relativamente pequeno de moléculas-sinal, usadas em diferentes combinações, exerça um controle complexo e refinado sobre o comportamento celular. Tais combinações de sinais podem evocar respostas que são diferentes da soma dos efeitos

(D) Acetilcolina

$$H_3C-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-CH_2-CH_2-\overset{\overset{\displaystyle CH_3}{|}}{\underset{\underset{\displaystyle CH_3}{|}}{N^+}}-CH_3$$

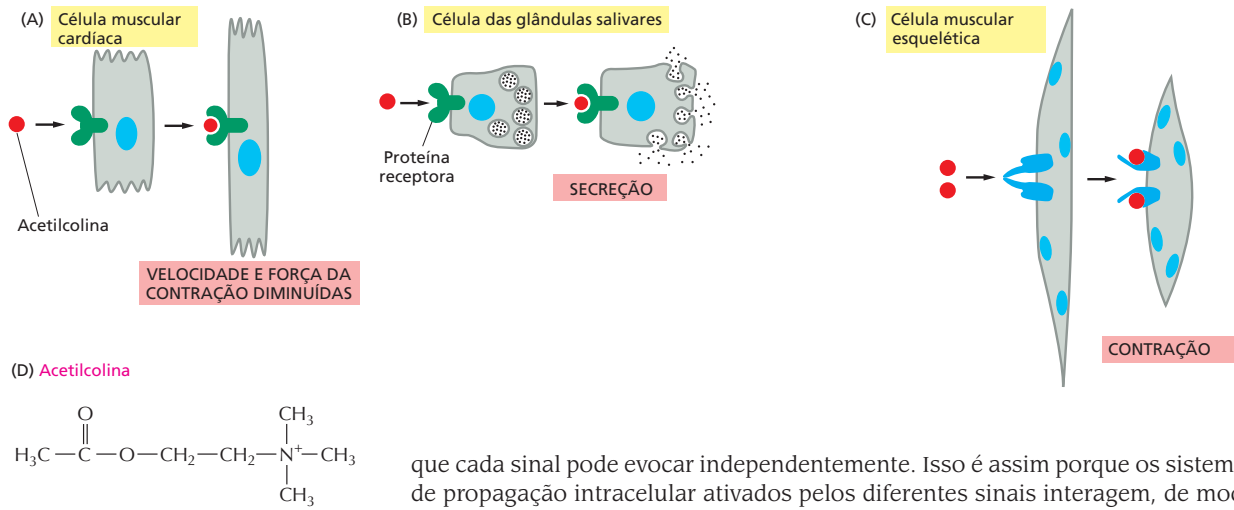



Figura 16-5 A mesma molécula-sinal pode produzir respostas distintas em células-alvo diferentes. Diferentes tipos celulares são configurados para responder ao neurotransmissor acetilcolina de modos distintos. A acetilcolina se liga a proteínas receptoras semelhantes nas células musculares cardíacas (A) e nas células das glândulas salivares (B), mas desencadeia respostas diferentes em cada um dos tipos celulares. As células musculares esqueléticas (C) possuem um tipo diferente de proteína receptora para o mesmo sinal. Como veremos, os tipos diferentes de receptores geram sinais intracelulares diversos, possibilitando, assim, que tipos variados de células musculares reajam à acetilcolina de modo distinto. (D) Estrutura química da acetilcolina. Para uma molécula tão versátil, a acetilcolina tem uma estrutura razoavelmente simples.

que cada sinal pode evocar independentemente. Isso é assim porque os sistemas de propagação intracelular ativados pelos diferentes sinais interagem, de modo que a presença de um sinal modifica a resposta a outro. Uma combinação de sinais permite a sobrevivência da célula; outra combinação leva à diferenciação especializada, e outra promove a divisão celular. A maioria das células animais está programada para cometer suicídio, na ausência de sinal (Figura 16-6).

A resposta celular a um sinal pode ser rápida ou lenta

O tempo que uma célula leva para responder a um sinal extracelular varia muito, dependendo do que deve acontecer após a mensagem ter sido recebida. Alguns sinais extracelulares agem rapidamente: a acetilcolina estimula a contração do músculo esquelético em milissegundos e a secreção das glândulas salivares em cerca de um minuto. Essa rápida resposta é possível porque, nesses casos, o sinal afeta a atividade de proteínas e outras moléculas que já estão presentes na célula-alvo, esperando para executar as ordens.

Outras respostas levam mais tempo. O crescimento e a divisão celular, quando desencadeados pelas moléculas-sinal adequadas, podem levar horas para ocorrerem. Isso é porque a resposta a esses sinais extracelulares requer mudanças na expressão gênica e a produção de novas proteínas (Figura 16-7).

Figura 16-6 A célula animal depende de múltiplos sinais extracelulares. Cada tipo celular possui um conjunto de receptores proteicos que lhe permite responder a um grupo específico de moléculas-sinal produzido por outras células. Essas moléculas atuam combinadamente na regulação do comportamento celular. Como mostrado aqui, muitas células requerem sinais múltiplos (*setas azuis*) para sobreviver, sinais adicionais (*setas vermelhas*) para se dividir e ainda outros sinais (*setas verdes*) para se diferenciar. Caso privadas dos sinais de sobrevivência adequados, a maioria das células sofre uma espécie de suicídio conhecido como morte celular programada ou apoptose (discutida no Capítulo 18).

Figura 16-7 Os sinais extracelulares agem lenta ou rapidamente. Determinados tipos de respostas celulares – como aumento do crescimento ou da divisão – envolvem mudanças na expressão gênica e na síntese de novas proteínas. Por isso, essas respostas ocorrem mais lentamente. Outras respostas – como mudanças no movimento, na secreção ou no metabolismo celular – não precisam de mudanças na expressão gênica e, por isso, ocorrem mais rapidamente (ver Figura 16-5).

Encontraremos outros exemplos de respostas lentas e rápidas – e das moléculas-sinal que as estimulam – mais adiante neste capítulo.

Alguns hormônios atravessam a membrana plasmática e se ligam a receptores intracelulares

As **moléculas-sinal extracelulares** pertencem, em geral, a duas classes. A primeira, e maior, consiste em moléculas que são grandes demais ou demasiadamente hidrofílicas para atravessar a membrana plasmática da célula-alvo. Elas contam com receptores na superfície da célula-alvo para transmitir sua mensagem pela membrana (Figura 16-8A). A segunda classe de sinais, menor, consiste em moléculas que são suficientemente pequenas ou hidrofóbicas para escorregar facilmente através da membrana plasmática. Essas moléculas-sinal, uma vez dentro da célula, ativam enzimas intracelulares ou se ligam a proteínas receptoras intracelulares que regulam a expressão gênica (Figura 16-8B).

Uma classe importante de moléculas-sinal que contam com proteínas receptoras intracelulares é a dos **hormônios esteroides** – incluindo *cortisol, estradiol,* e *testosterona* – e os *hormônios da tireoide*, como a *tiroxina* (Figura 16-9). Todas essas moléculas hidrofóbicas passam através da membrana plasmática das células-alvo e se ligam a proteínas receptoras localizadas no citosol ou no núcleo. Esses receptores, tanto citosólicos como nucleares, são denominados *receptores nucleares,* porque, ao serem ativados pela ligação ao hormônio, atuam como reguladores transcricionais no núcleo (discutido no Capítulo 8). Nas células não estimuladas, os receptores nucleares se encontram na forma inativa. Quando ocorre a ligação ao hormônio, o receptor passa por uma grande mudança conformacional que ativa a proteína, tornando-a capaz de promover ou inibir a transcrição de genes-alvo específicos (Figura 16-10). Cada hormônio se liga a uma proteína receptora diferente, e cada receptor atua sobre um conjunto diferente, de sítios reguladores no DNA (discutido no Capítulo 8). Além disso, um dado hormônio geralmente regula diferentes grupos de genes em diferentes tipos celulares, evocando, dessa forma, respostas fisiológicas diferentes em tipos diferentes de células-alvo.

Os receptores nucleares e os hormônios que os ativam são essenciais na fisiologia humana (ver Tabela 16-1, p. 535). A perda desses sistemas de sinalização pode ter consequências dramáticas, conforme exemplificado pelo que acontece com indivíduos que perdem o receptor do hormônio sexual masculino, testosterona. Esse hormônio modela a formação da genitália externa e influencia o desenvolvimento cerebral do feto. Na puberdade, ele desencadeia o desen-

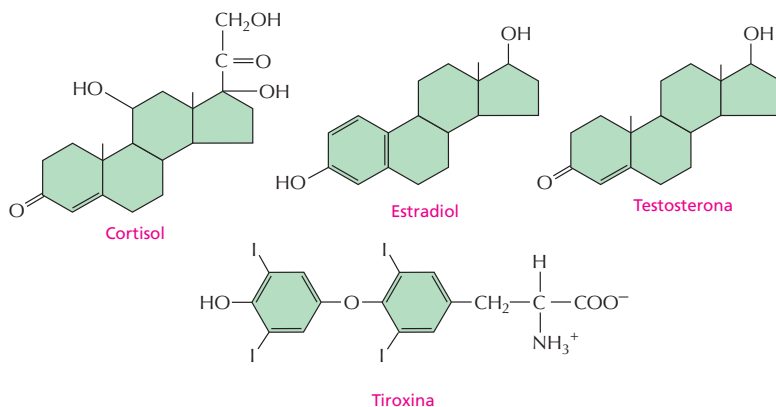
Figura 16-8 Moléculas-sinal extracelulares se ligam a receptores de superfície celular ou a receptores ou enzimas intracelulares. (A) A maioria das moléculas-sinal é grande e hidrofílica e, por isso, são incapazes de atravessar a membrana plasmática. Elas se ligam aos receptores de superfície, os quais geram um ou mais sinais no interior da célula-alvo (conforme mostrado na Figura 16-7). (B) Algumas moléculas-sinal pequenas e hidrofóbicas, ao contrário, difundem-se pela membrana plasmática da célula-alvo e ativam enzimas ou se ligam a receptores intracelulares, seja no citoplasma, seja no núcleo (conforme mostrado).

Figura 16-9 Alguns hormônios hidrofóbicos pequenos se ligam a receptores intracelulares que atuam como reguladores transcricionais. Embora essas moléculas-sinal sejam diferentes em estrutura e função, todas se ligam a proteínas receptoras intracelulares. Seus receptores não são idênticos, mas são evolutivamente relacionados, pertencendo à *superfamília de receptores nucleares* de reguladores transcricionais. Os locais de origem e as funções desses hormônios estão relacionados na Tabela 16-1 (p. 535).

Cortisol

Estradiol

Testosterona

Tiroxina

QUESTÃO 16-2

Considere a estrutura do colesterol, uma pequena molécula hidrofóbica com um esqueleto de esterol semelhante ao de três dos hormônios mostrados na Figura 16-9, porém com menos grupos polares, como – OH, =O e – COO^-. Caso o colesterol não fosse normalmente encontrado nas membranas celulares, ele poderia ser usado como um hormônio se surgisse um receptor intracelular adequado?

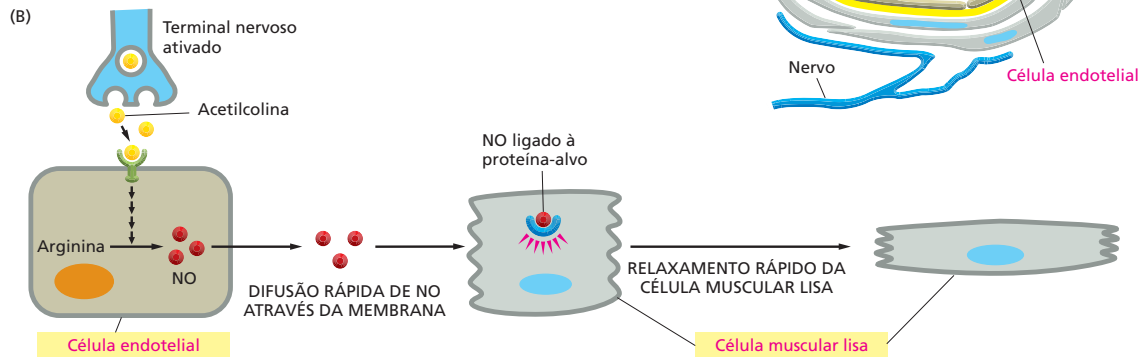
Colesterol

volvimento das características sexuais secundárias masculinas. Alguns indivíduos, muito raros, são geneticamente machos (isto é, possuem um cromossomo Y e um X), mas não possuem o receptor para a testosterona em virtude de uma mutação no gene correspondente. Eles produzem o hormônio, mas suas células não respondem a ele. Como resultado, esses indivíduos se desenvolvem como fêmeas, que é a rota do desenvolvimento sexual e cerebral que ocorreria na ausência dos hormônios masculinos e femininos. Essa reversão sexual demonstra o papel-chave do receptor para testosterona no desenvolvimento sexual, mostrando também que o receptor é necessário não somente em um tipo celular, mas em muitos tipos celulares para auxiliar na produção de toda a gama de características que distingue os homens das mulheres.

Alguns gases dissolvidos atravessam a membrana plasmática e ativam diretamente enzimas intracelulares

Os hormônios esteroides e os hormônios da tireoide não são as únicas moléculas-sinal que podem atravessar a membrana plasmática. Alguns gases dissolvidos podem mover-se através da membrana para o interior da célula e regular diretamente a atividade de proteínas intracelulares específicas. Essa ativação direta permite que esses sinais alterem uma célula dentro de poucos segundos

Figura 16-10 O hormônio esteroide cortisol atua pela ativação de um regulador de transcrição. O cortisol é um dos hormônios produzidos pelas glândulas adrenais em resposta ao estresse. Ele se difunde pela membrana plasmática e se liga à sua proteína receptora que está no citosol. O complexo hormônio-receptor entra no núcleo pelos poros nucleares. A ligação do cortisol ativa o receptor, o que o torna capaz de se ligar a sequências reguladoras específicas no DNA e ativar (ou reprimir, não mostrado) a transcrição de genes-alvo específicos. Enquanto os receptores para o cortisol e para outros hormônios esteroides estão localizados no citosol, aqueles para outras moléculas-sinal dessa família já estão ligados ao DNA no núcleo, mesmo na ausência do hormônio.

Figura 16-11 O óxido nítrico (NO) desencadeia relaxamento (A) da musculatura lisa da parede dos vasos sanguíneos. (A) O desenho mostra um nervo em contato com um vaso sanguíneo. (B) Sequência de eventos que leva à dilatação do vaso. A acetilcolina é liberada pelos terminais nervosos na parede do vaso. Ela se difunde pelas células da musculatura lisa e atravessa a lâmina basal (não mostrado) para encontrar os seus receptores na superfície das células endoteliais que revestem o vaso sanguíneo, estimulando-as a produzir e liberar NO. O NO se difunde das células endoteliais para as células musculares lisas adjacentes e regula a atividade de proteínas específicas, causando o relaxamento das células musculares. (C) Uma proteína-alvo que pode ser ativada pelo NO é a guanilato-ciclase. A ciclase ativada catalisa a produção de GMP cíclico a partir de GTP. Note que o NO é um gás altamente tóxico quando inalado e não deve ser confundido com o óxido nitroso (N_2O), também conhecido como gás do riso.

ou minutos. O **óxido nítrico** (**NO**) atua dessa forma. Esse gás se difunde facilmente para fora da célula que o produz e penetra nas células vizinhas. O NO é sintetizado a partir do aminoácido arginina e atua como um mediador local em muitos tecidos. O gás age só localmente porque é convertido de forma rápida em nitratos e nitritos (com uma meia-vida de 5 a 10 segundos) pela reação com o oxigênio e a água no exterior da célula.

As células endoteliais – as células achatadas que revestem os vasos sanguíneos – liberam NO em resposta à estimulação pelos terminais nervosos. Esse sinal do NO causa o relaxamento da musculatura lisa do vaso, fazendo esse dilatar, de modo que o sangue possa fluir mais livremente (**Figura 16-11**). O efeito do NO nos vasos sanguíneos é o responsável pela ação da nitroglicerina, que tem sido usada há quase 100 anos no tratamento de pacientes com angina – dor causada pelo fluxo sanguíneo inadequado para o músculo cardíaco. No corpo, a nitroglicerina é convertida em NO, que rapidamente relaxa os vasos sanguíneos, reduzindo, assim, a carga sobre o coração e diminuindo a necessidade muscular por sangue rico em oxigênio. Muitas células nervosas também usam o NO para sinalizar para células vizinhas: a liberação de NO pelos terminais nervosos no pênis, por exemplo, desencadeia uma dilatação local dos vasos sanguíneos que é responsável pela ereção peniana.

No interior de muitas células-alvo, o NO se liga à enzima *guanilato-ciclase* e estimula a formação de *GMP cíclico* a partir do nucleotídeo GTP (ver Figura 16-11C). O próprio GMP cíclico é uma molécula sinalizadora intracelular pequena que forma a conexão seguinte na cadeia de sinalização do NO que leva à resposta celular final. O fármaco Viagra contra a impotência aumenta a ereção peniana porque bloqueia a enzima que degrada o GMP cíclico, prolongando o sinal do NO. O GMP cíclico é similar, em estrutura e mecanismo de ação, ao *AMP cíclico,* uma molécula mensageira intracelular muito mais utilizada, cujas ações serão discutidas mais tarde.

Os receptores de superfície celular transmitem os sinais extracelulares por meio de vias intracelulares de sinalização

A grande maioria das moléculas-sinal, em contraste com o NO e com os hormônios esteroides e tireoideanos, são grandes demais ou muito hidrofílicas para

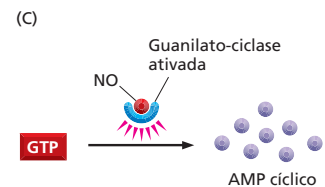
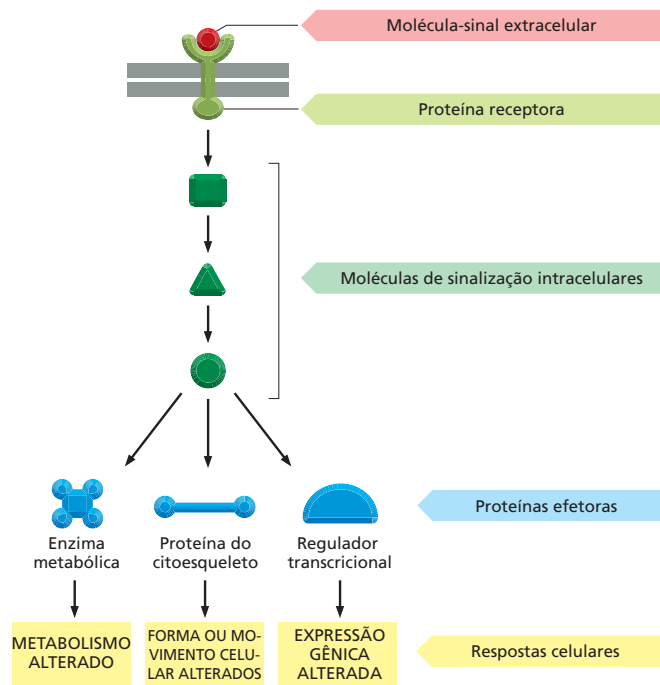



Figura 16-12 Muitos sinais extracelulares atuam via receptores de superfície celular e alteram o comportamento da célula. A proteína receptora ativa uma ou mais vias de sinalização intracelular, cada uma delas mediada por uma série de moléculas de sinalização intracelular, que podem ser proteínas ou moléculas mensageiras pequenas. A figura mostra somente uma via. Algumas dessas moléculas de sinalização interagem com proteínas efetoras específicas, alterando-as de forma a mudar de várias maneiras o comportamento celular.

QUESTÃO 16-3

Em princípio, como uma proteína sinalizadora intracelular poderia amplificar o sinal à medida que o transmite para frente?

atravessar a membrana plasmática das células-alvo. Essas proteínas, peptídeos e outras moléculas pequenas e hidrossolúveis se ligam a proteínas receptoras da superfície celular que transpassam a membrana plasmática (Figura 16-8A). Os receptores transmembrana detectam o sinal no lado de fora e transmitem a mensagem, de uma forma nova, pela membrana para o interior da célula.

A proteína receptora executa a etapa inicial da transdução do sinal: ela se liga a um sinal extracelular e gera, em resposta, novos sinais intracelulares (ver Figura 16-2B). O processo de sinalização intracelular resultante geralmente funciona como uma corrida de revezamento molecular na qual a mensagem passa de uma **molécula de sinalização intracelular** para outra, em que cada uma ativa ou gera a próxima molécula de sinalização até que, por exemplo, uma enzima metabólica é posta em ação, o citoesqueleto é forçado a assumir uma nova configuração ou um gene é ligado ou desligado. Esse resultado é denominado *resposta* da célula (Figura 16-12).

Os componentes dessas **vias de sinalização intracelular** executam uma ou várias funções cruciais (Figura 16-13):

1. Eles podem simplesmente *transmitir* o sinal para diante e dessa forma auxiliar na sua propagação por toda a célula.
2. Eles podem *amplificar* o sinal recebido, tornando-o mais forte, de forma que poucas moléculas-sinal extracelulares são suficientes para evocar uma resposta intracelular intensa.
3. Eles podem receber sinais de mais de uma via de sinalização intracelular e *integrá-los* antes de transmitir o sinal para diante.
4. Eles podem *distribuir* o sinal para mais de uma via de sinalização intracelular ou proteína efetora, podendo criar ramificações no diagrama do fluxo de informações e evocar uma resposta complexa.

Além da função de integração, muitas etapas em uma via de sinalização estão sujeitas à *modulação* por outros fatores, incluindo fatores extra e intracelulares, de modo que os efeitos do sinal podem ser adaptados às condições predominantes dentro ou fora da célula.

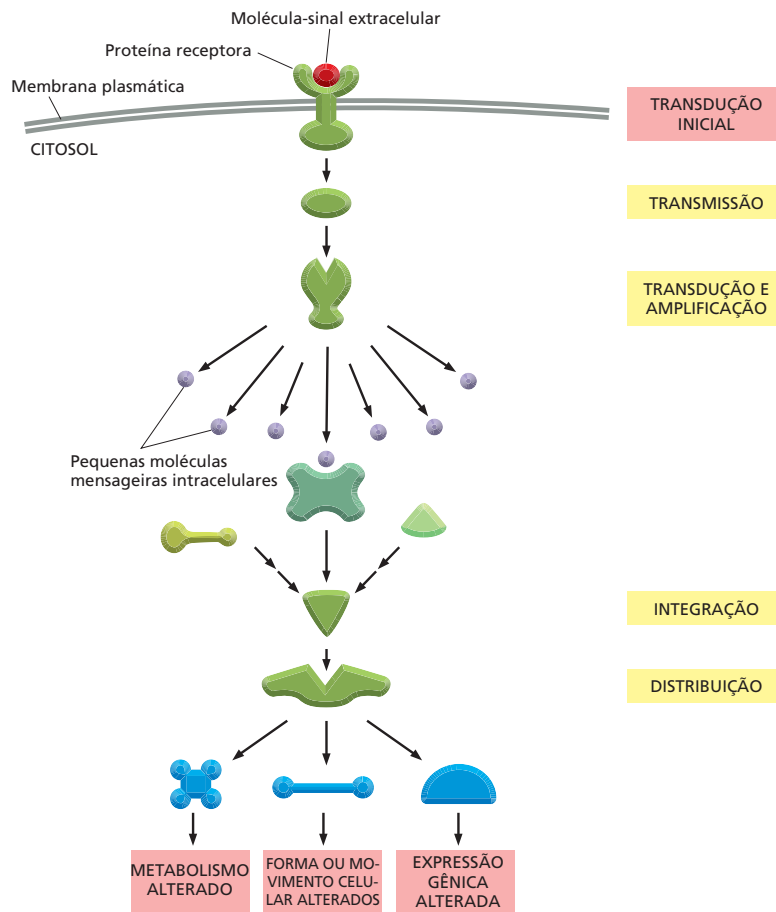
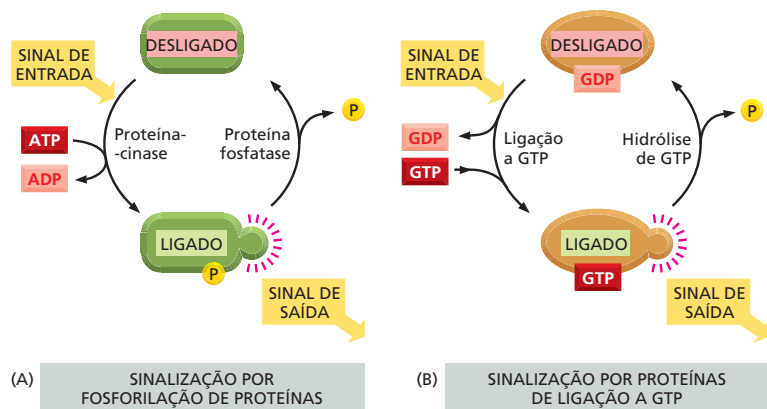



Figura 16-13 Proteínas de sinalização intracelular transmitem, amplificam, integram e distribuem o sinal que chega. Uma proteína receptora localizada na superfície da célula transforma um sinal extracelular em um sinal intracelular, o qual inicia uma ou mais vias de sinalização que transmitem o sinal para o interior da célula. Cada via inclui proteínas de sinalização intracelular que podem funcionar das várias maneiras mostradas: algumas, por exemplo, integram os sinais de outras vias de sinalização, como está mostrado. Muitas etapas do processo podem ser moduladas por outros eventos ou por outras moléculas na célula (não mostrado). Discutiremos a produção e a função das moléculas mensageiras intracelulares pequenas mais adiante no capítulo.

Algumas proteínas de sinalização intracelulares atuam como interruptores moleculares

Muitas das proteínas de sinalização intracelulares essenciais se comportam como **interruptores moleculares**: a recepção de um sinal faz com que comutem de um estado inativo para um ativo. Essas proteínas, uma vez ativadas, podem ativar outras proteínas na via de sinalização. Elas então permanecem no estado ativo até que algum outro processo as desligue. A importância do processo de desligamento é, com frequência, subestimada. Para que uma via de sinalização se recupere após transmitir um sinal e fique apta a transmitir outro, cada proteína ativada deve retornar ao seu estado original não estimulado. Portanto, para cada etapa de ativação ao longo da via, deve haver um mecanismo de inativação. Os dois são igualmente importantes para o processo de sinalização.

As proteínas que atuam como comutadores moleculares pertencem principalmente a duas classes. A primeira, e de longe a maior, consiste em proteínas que são ativadas ou inativadas por fosforilação, uma modificação química discutida no Capítulo 4 (ver Figura 4-38). No caso dessas moléculas, o comutador é acionado em uma direção por uma **proteína-cinase** que adiciona, à proteína, um grupo fosfato, e na outra direção, por uma **proteína-fosfatase**, que remove o fosfato (Figura 16-14A). A atividade de qualquer proteína que seja regulada por fosforilação depende – a cada momento – do equilíbrio entre as atividades das cinases que as fosforilam e das fosfatases que as desfosforilam.

Figura 16-14 Muitas proteínas sinalizadoras intracelulares funcionam como interruptores moleculares. (A) Algumas proteínas sinalizadoras intracelulares são ativadas pela adição de um grupo fosfato e inativadas pela remoção do fosfato. Em alguns casos, o fosfato é ligado covalentemente à proteína por uma proteína-cinase que transfere o fosfato terminal de um ATP para a proteína. O fosfato é removido por uma fosfatase. (B) Em outros casos, a proteína sinalizadora que se liga a GTP é induzida a trocar sua GDP por GTP (o que, de certo modo, adiciona um fosfato à proteína). Isto ativa a proteína. A hidrólise da GTP a GDP então a inativa.

Muitas das proteínas comutadoras controladas por fosforilação são, elas próprias, proteínas e estão organizadas em *cascatas de fosforilação:* uma proteína-cinase, ativada por fosforilação, fosforila a cinase seguinte e assim por diante, transmitindo o sinal para diante, e nesse processo ocorrem a amplificação, a propagação e a modulação do sinal. Dois tipos principais de proteína-cinases atuam nas vias de sinalização intracelular: as mais comuns são as **serina/treonina-cinases**, as quais, como o nome indica, fosforilam as serinas e treoninas das proteínas; as outras são as tirosina-cinases, que fosforilam as tirosinas das proteínas.

A outra classe importante de proteínas comutadoras envolvidas em vias de sinalização intracelular consiste nas **proteínas de ligação a GTP**. Essas comutam entre o estado ativo e inativo na dependência de terem, respectivamente, GTP ou GDP ligados a elas (Figura 16-14B). Quando ativadas pela ligação ao GTP, essas proteínas apresentam atividade intrínseca de hidrólise de GTP (GTPases) e fazem autoinativação ao hidrolisarem seu GTP a GDP. Uma classe de proteínas comutadoras ativadas por GTP inclui as proteínas de ligação a GTP grandes e triméricas (também chamadas de proteínas G) que transmitem mensagens de *receptores associados a proteínas G*, conforme será discutido com detalhes em breve.

Os receptores de superfície celular pertencem a três classes principais

Todas as proteínas receptoras de superfície celular se ligam a uma molécula-sinal extracelular e transduzem sua mensagem para uma ou mais moléculas sinalizadoras intracelulares que alteram o comportamento da célula. Esses receptores, contudo, são divididos em três grandes famílias que diferem nos mecanismos de transdução utilizados. (1) Os *receptores associados a canais iônicos* permitem um fluxo de íons através da membrana plasmática, que altera o potencial de membrana e produz uma corrente elétrica (**Figura 16-15A**). (2) Os *receptores associados a proteínas G* ativam as proteínas triméricas de ligação a GTP ligadas à membrana (proteínas G), as quais então ativam uma enzima ou um canal iônico na membrana plasmática, dando início a uma cascata de outros efeitos (Figura 16-15B). (3) Os *receptores associados a enzimas* atuam como enzimas ou se associam a enzimas dentro da célula (Figura 16-15C); essas enzimas, quando estimuladas, ativam uma variedade de vias de sinalização intracelular.

O número de tipos diferentes de receptores nessas três classes é ainda maior do que o número de sinais extracelulares que agem sobre eles, porque, para muitas moléculas sinalizadoras, existe mais de um tipo de receptor. Além disso, algumas moléculas sinalizadoras se ligam a receptores de mais de uma classe. O neurotransmissor acetilcolina, por exemplo, atua nas células da musculatura esquelética por meio de um receptor associado a um canal iônico, ao passo que, nas células da musculatura cardíaca, ele age por meio de um receptor associado à proteína G. Esses dois tipos de receptores geram sinais intracelulares diferentes, o que permite que os dois tipos de células musculares reajam à

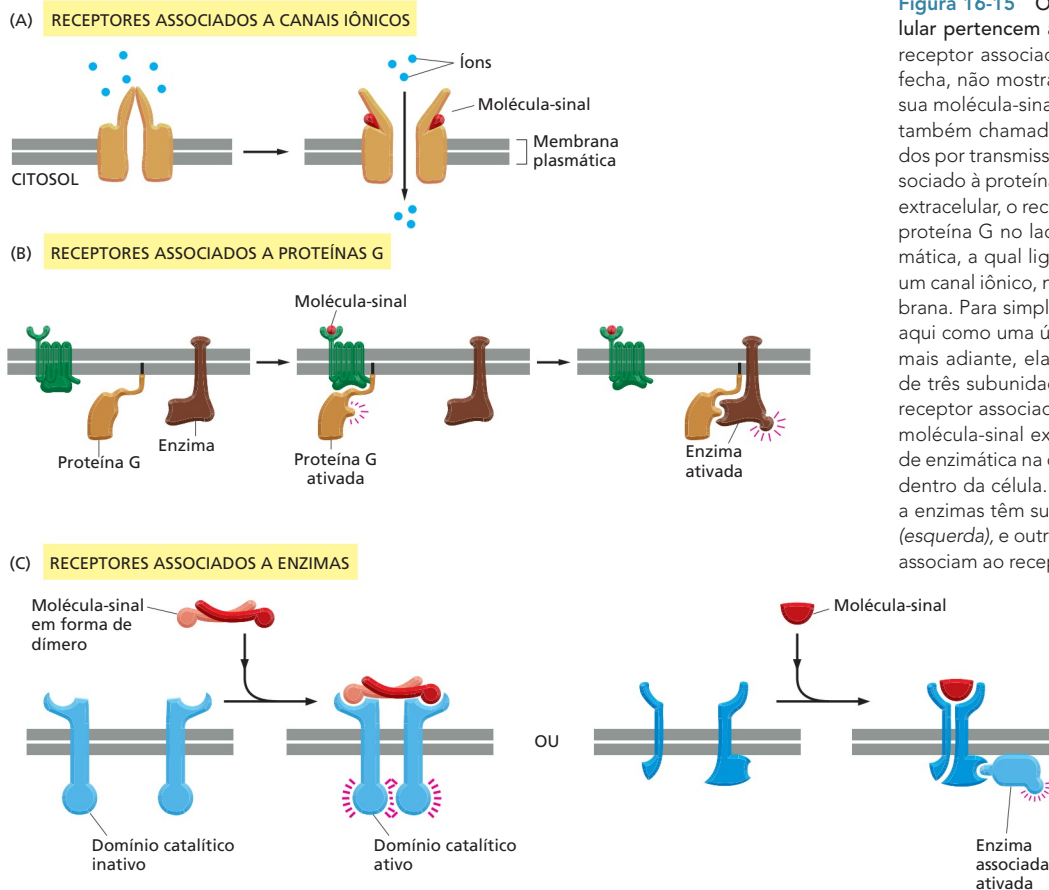



Figura 16-15 Os receptores de superfície celular pertencem a três classes básicas. (A) Um receptor associado a um canal iônico abre (ou fecha, não mostrado) em resposta à ligação de sua molécula-sinal extracelular. Esses canais são também chamados de canais iônicos controlados por transmissor. (B) Quando um receptor associado à proteína G se liga à sua molécula-sinal extracelular, o receptor ativado sinaliza para uma proteína G no lado oposto da membrana plasmática, a qual liga (ou desliga) uma enzima (ou um canal iônico, não mostrado) na mesma membrana. Para simplificar, a proteína G é mostrada aqui como uma única molécula. Como veremos mais adiante, ela é, na verdade, um complexo de três subunidades proteicas. (C) Quando um receptor associado a enzimas interage com sua molécula-sinal extracelular, aciona uma atividade enzimática na outra extremidade do receptor, dentro da célula. Muitos receptores associados a enzimas têm sua própria atividade enzimática *(esquerda)*, e outros contam com enzimas que se associam ao receptor ativado *(direita)*.

acetilcolina de maneira diferente, aumentando a contração no músculo esquelético e reduzindo a frequência de contrações no coração (ver Figura 16-5A e C).

O grande número de receptores de superfície diferentes que o corpo necessita para os propósitos de sinalização são também alvos para muitas substâncias estranhas que interferem na nossa fisiologia e nas nossas sensações, desde a heroína e a nicotina, até tranquilizantes e pimentas. Essas substâncias mimetizam o ligante natural de um determinado receptor, ocupando os sítios de ligação do ligante natural, ou se ligam ao receptor em algum outro sítio, causando bloqueio ou superestimulação da atividade natural do receptor. Muitas drogas e venenos atuam dessa forma (**Tabela 16-2**), e uma grande parte da indústria

TABELA 16-2 Algumas substâncias estranhas que agem sobre receptores de superfície celular

Substância	Molécula-sinal	Ação sobre o receptor	Efeito
Valium e barbitúricos	Ácido γ-aminobutírico (GABA)	Estimula receptores associados a canais iônicos ativados por GABA	Alívio de ansiedade; sedação
Nicotina	Acetilcolina	Estimula receptores associados a canais iônicos ativados por acetilcolina	Constrição dos vasos sanguíneos; elevação da pressão sanguínea
Morfina e heroína	Endorfinas e encefalinas	Estimula receptores opiáceos associados à proteína G	Analgesia (alívio da dor); euforia
Curare	Acetilcolina	Bloqueia receptores associados a canais iônicos ativados por acetilcolina	Bloqueio da transmissão neuromuscular, resultando em paralisia
Estricnina	Glicina	Bloqueia receptores associados a canais iônicos ativados por glicina	Bloqueio das sinapses inibitórias na medula espinal e no cérebro, resultando em espasmos musculares e ataques

farmacêutica se dedica à procura de substâncias que exerçam um efeito definido pela ligação a um tipo específico de receptor de superfície celular.

Receptores associados a canais iônicos convertem sinais químicos em sinais elétricos

QUESTÃO 16-4

Os mecanismos de sinalização usados por um receptor nuclear de hormônio esteroide e por um receptor associado a canais iônicos são relativamente simples porque possuem poucos componentes. Eles podem levar a uma amplificação do sinal inicial? Em caso afirmativo, explique como.

Dentre todos os tipos de receptores de superfície celular, os *receptores associados a canais iônicos* (também conhecidos como canais iônicos controlados por transmissores) são os que funcionam da maneira mais simples e direta. Esses receptores são responsáveis pela transmissão rápida de sinais pelas sinapses no sistema nervoso. Eles transformam o sinal químico, na forma de um pulso de neurotransmissor liberado no exterior da célula-alvo, em um sinal elétrico, na forma de uma mudança de voltagem pela membrana plasmática dessa mesma célula (ver Figura 12-42). Esse tipo de receptor modifica sua conformação após a ligação do neurotransmissor, o que leva à abertura ou fechamento de um canal para o fluxo de íons específicos – como Na^+, K^+, Ca^{2+} ou Cl^- – pela membrana plasmática (ver Figura 16-15A e **Animação 16.1**). Conduzidos por seus gradientes eletroquímicos, os íons correm para dentro ou para fora da célula, criando, no tempo de um milissegundo, uma mudança no potencial de membrana. Essa mudança no potencial pode desencadear um impulso nervoso, ou tornar mais fácil (ou mais difícil) que outros neurotransmissores o façam. A abertura dos canais de Ca^{2+} tem efeitos especiais, já que mudanças na concentração intracelular desse íon podem alterar profundamente as atividades de muitas proteínas que respondem ao Ca^{2+}, como veremos mais adiante neste capítulo. A função dos receptores associados a canais iônicos é apresentada com mais detalhes no Capítulo 12.

Enquanto os receptores associados a canais iônicos são uma especialidade do sistema nervoso e de outras células eletricamente excitáveis, como as células musculares, os receptores associados à proteína G e associados a enzimas são utilizados por praticamente todos os tipos celulares do corpo. A maior parte do restante deste capítulo será dedicada às famílias desses receptores e aos processos de transdução de sinal que os mesmos utilizam.

RECEPTORES ASSOCIADOS À PROTEÍNA G

Figura 16-16 Todos os receptores associados à proteína G possuem estrutura similar. As porções citoplasmáticas do receptor são responsáveis pela ligação à proteína G dentro da célula. Os receptores que ligam moléculas-sinal proteicas possuem, geralmente, um grande domínio extracelular (*verde-claro*). Esse domínio, juntamente com alguns dos segmentos transmembrana, interage com a proteína ligante. No entanto, os receptores que reconhecem moléculas-sinal pequenas, como a adrenalina ou a acetilcolina, possuem um domínio intracelular pequeno, e o ligante geralmente interage dentro do plano da membrana em um sítio formado por aminoácidos de vários segmentos transmembrana (não mostrado).

Os **receptores associados à proteína G** (**GPCRs**, de *G-Protein-Coupled Receptors*) formam a família mais numerosa dos receptores de superfície celular. Existem mais de 700 GPCRs nos humanos, e os camundongos possuem cerca de 1.000 relacionados somente com a sensação de olfato. Esses receptores medeiam respostas a uma enorme diversidade de moléculas-sinal extracelulares, incluindo hormônios, mediadores locais e neurotransmissores. Essas moléculas são tão variadas em estrutura como o são em função: elas podem ser proteínas, pequenos peptídeos ou derivados de aminoácidos ou de ácidos graxos, e para cada uma delas existe um receptor ou um conjunto de receptores diferentes. Uma vez que os GPCRs estão envolvidos em uma variedade tão grande de processos celulares, eles são um alvo atraente para o desenvolvimento de fármacos para tratar uma variedade de distúrbios. Cerca da metade de todos os fármacos conhecidos atuam por meio de GPCRs.

Apesar da diversidade das moléculas sinalizadoras que se ligam a eles, todos os GPCRs analisados possuem estrutura semelhante: cada um é formado por uma única cadeia polipeptídica que atravessa a bicamada lipídica sete vezes (**Figura 16-16**). Essa superfamília de *proteínas receptoras transmembrana de sete passagens* inclui a rodopsina (a proteína fotorreceptora ativada pela luz no olho dos vertebrados), os receptores olfatórios (de odor) nas fossas nasais dos vertebrados e os receptores que participam dos rituais de acasalamento das leveduras unicelulares (ver Figura 16-1). Os receptores associados à proteína G são, evolutivamente, antigos: até as bactérias possuem proteínas de membrana estruturalmente semelhantes – como a bacteriorrodopsina que funciona como uma bom-

Figura 16-17 Um receptor associado à proteína G ativado ativa-a encorajando a subunidade α a abandonar seu GDP e captar um GTP. (A) No estado não estimulado, o receptor e a proteína G estão inativos. Embora sejam mostrados aqui como entidades separadas na membrana plasmática, em alguns casos, pelo menos, eles estão associados em um complexo pré-formado. (B) A ligação de um sinal extracelular ao receptor muda sua conformação, o que, por sua vez, altera a configuração da proteína G que está ligada a ele. A alteração da subunidade α da proteína G permite que ela troque seu GDP por GTP. Essa troca desencadeia uma mudança conformacional que ativa a subunidade α e o complexo βγ, os quais podem interagir com suas proteínas-alvo preferidas na membrana plasmática (**Animação 16.2**). O receptor permanece ativo enquanto a molécula-sinal externa estiver ligada a ele e, por isso, pode catalisar a ativação de muitas moléculas de proteína G. Apesar de se ter pensado originalmente que a ativação de uma proteína G causaria sempre a dissociação física da subunidade α do complexo βγ (como está mostrado aqui), em alguns casos, o trímero simplesmente se abriria, permitindo a interação tanto da subunidade α ativada como do complexo βγ com suas proteínas-alvo. Note que as subunidades α e γ possuem moléculas lipídicas ligadas covalentemente (em *vermelho*) que auxiliam sua ancoragem à membrana plasmática.

ba de H^+ impulsionada pela luz (ver Figura 11-28). Apesar de serem semelhantes aos receptores dos eucariotos, esses receptores bacterianos não atuam por meio de proteínas G; eles estão acoplados a outros sistemas de transdução.

A estimulação dos receptores associados à proteína G ativa as subunidades dessa proteína

A ligação de uma molécula sinalizadora extracelular ao GPCR induz nele uma mudança conformacional que permite a ele ativar uma **proteína G** localizada na face interna da membrana plasmática. Para explicar como essa ativação leva à transmissão do sinal, devemos considerar primeiramente como as proteínas G são construídas e como funcionam.

Existem vários tipos de proteínas G. Cada uma é específica para um grupo particular de receptores e um grupo particular de enzimas-alvo ou canais iônicos na membrana plasmática. No entanto, todas essas proteínas G são semelhantes na sua estrutura geral e desempenham suas funções de forma semelhante. São formadas por três subunidades – α, β e γ –, duas das quais estão unidas à membrana plasmática por caudas lipídicas curtas. No estado não estimulado, a subunidade α possui um GDP ligado, e a proteína G está inativa (Figura 16-17A). A interação de um ligante extracelular com seu receptor causa sua alteração e a consequente ativação da proteína G pela perda da afinidade da subunidade α por GDP, que é trocado por uma molécula de GTP. Acredita-se que, em alguns casos, essa ativação separe as subunidades da proteína G, de forma que a subunidade α ativada apanha seu GTP e se desliga do complexo βγ, que também é ativado (Figura 16-17B). Independentemente de como se dissociam, as duas partes da proteína G ativadas – a subunidade α e o complexo βγ – podem interagir diretamente com as proteínas-alvo localizadas na membrana plasmática, as quais, por sua vez, podem transmitir o sinal para outros destinos na célula. Quanto maior for o tempo de interação entre as proteínas-alvo e as subunidades α ou βγ, mais forte e mais prolongado será o sinal transmitido.

O espaço de tempo em que as subunidades α e βγ permanecem "ligadas" – e, portanto, disponíveis para transmitir sinais – é limitado pelo comportamento da subunidade α. Essa subunidade tem uma atividade intrínseca de GTPase e, consequentemente, hidrolisa seu GTP a GDP, associando-se novamente, fazendo com que a proteína G inteira retorne à sua conformação original inativa (Figura 16-18). A hidrólise de GTP e a inativação ocorrem dentro de segundos após a ativação da proteína G. Essa, agora está pronta para ser reativada por outro receptor ativo.

O interruptor da proteína G demonstra um princípio geral da sinalização celular mencionado anteriormente: os mecanismos que desligam um sinal são tão importantes quanto os mecanismos que os ligam (ver Figura 16-14B). Eles proporcionam muitas oportunidades para controle e muitos riscos de erros. Considere, por exemplo, o cólera. A doença é causada por uma bactéria que se multiplica no intestino, onde produz uma proteína denominada *toxina do cólera.* Essa proteína penetra nas células que revestem o intestino, modificando a subunidade α de uma proteína G (chamada de G_s, porque *estimula* a enzima adenilato-ciclase, apresentada mais adiante) de tal forma que ela perde a capacidade de hidrolisar sua GTP. A subunidade α alterada permanece ativada de forma permanente, transmitindo continuamente o sinal para suas proteínas-alvo. Isso provoca nas células intestinais um efluxo prolongado e excessivo de Ca^{2+} e de água para o intestino, resultando em uma diarreia catastrófica e em desidratação. A condição frequentemente leva à morte, a menos que sejam tomadas medidas urgentes para repor a água e os íons perdidos.

Uma situação semelhante ocorre na coqueluche *(pertússis),* uma infecção respiratória comum, contra a qual as crianças são vacinadas rotineiramente hoje em dia. Nesse caso, a bactéria causadora da doença coloniza o pulmão, onde ela produz uma proteína denominada *toxina pertússis.* Essa proteína altera a subunidade α de um tipo diferente de proteína G (chamada de G_i, porque *inibe* a adeni-

QUESTÃO 16-5

Receptores associados à proteína G ativam essas proteínas porque reduzem a força da ligação a GDP. Isso resulta em uma dissociação rápida do GDP ligado, que é substituído por um GTP, que está presente no citoplasma em concentração muito mais alta do que o GDP. Quais seriam as consequências de uma mutação que causasse a redução da afinidade da subunidade α pelo GDP, sem mudança significativa na sua afinidade pelo GTP? Compare os efeitos dessa mutação com os efeitos da toxina do cólera.

Figura 16-18 A subunidade α da proteína G se inativa ao hidrolisar seu GTP ligado. Quando a subunidade α ativada se liga à sua proteína-alvo, ela a ativa (ou, em alguns casos, a inativa; não mostrado) pelo período em que as duas proteínas permanecem ligadas uma à outra. Após alguns segundos, o GTP na subunidade α é hidrolisado a GDP. Essa perda de GTP inativo a subunidade α, que se dissocia da sua proteína-alvo e – se ela estiver separada do complexo βγ (como está mostrado aqui) – reassocia-se ao complexo βγ para tornar a formar uma proteína G inativa. A proteína G está agora pronta para se acoplar a outro receptor, como na Figura 16-17B. Tanto a subunidade α ativada como o complexo βγ podem interagir com proteínas-alvo na membrana plasmática. Veja também **Animação 16.2**.

lato-ciclase). Nesse caso, contudo, a modificação produzida pela toxina inativa a proteína G porque a bloqueia em seu estado ligado ao GDP. A inibição de G_i, assim como a ativação da G_s, resulta na geração de um sinal prolongado e inadequado que nesse caso estimula a tosse. Os efeitos da toxina do cólera na produção de diarreia e os da toxina da pertússis no desencadeamento da tosse auxiliam as bactérias causadoras dessas doenças a se mover de hospedeiro a hospedeiro.

Algumas proteínas G regulam canais iônicos

As proteínas-alvo reconhecidas pelas subunidades da proteína G são canais iônicos ou enzimas ligadas à membrana plasmática. Existem, nos mamíferos, cerca de 20 tipos de proteínas G ativadas por conjuntos particulares de receptores de superfície celular e dedicadas a ativar um conjunto particular de proteínas-alvo. Dessa forma, a ligação de uma molécula sinalizadora extracelular a um receptor associado à proteína G gera efeitos em um subgrupo específico de possíveis proteínas-alvo na membrana plasmática, provocando uma resposta apropriada para o determinado sinal e para o determinado tipo celular.

Vamos analisar em primeiro lugar um exemplo de regulação de canais iônicos por proteína G. O batimento cardíaco nos animais é controlado por dois grupos de fibras nervosas: um acelera o coração, e o outro diminui seus batimentos. As fibras que sinalizam uma redução dos batimentos o fazem pela liberação de acetilcolina, que se liga a um receptor associado à proteína G na superfície das células musculares cardíacas. Esse receptor ativa uma proteína G, G_i. Nesse caso, o componente ativo na sinalização é o complexo βγ: ele se liga à face intracelular de um canal de K^+ na membrana da célula muscular cardíaca, forçando-o a manter uma conformação aberta (**Figura 16-19A**). Isso permite o efluxo de K^+ inibindo, dessa forma, a excitabilidade elétrica celular (Figura 16-19B). O sinal é desligado – e o canal se fecha – quando uma subunidade α hidrolisa sua GTP, sofrendo, assim, autoinativação, e a proteína G retorna ao seu estado inativo (Figura 16-19C).

Algumas proteínas G ativam enzimas ligadas à membrana

A interação das proteínas G com os canais iônicos causa uma mudança imediata no estado e no comportamento da célula. Suas interações com enzimas têm con-

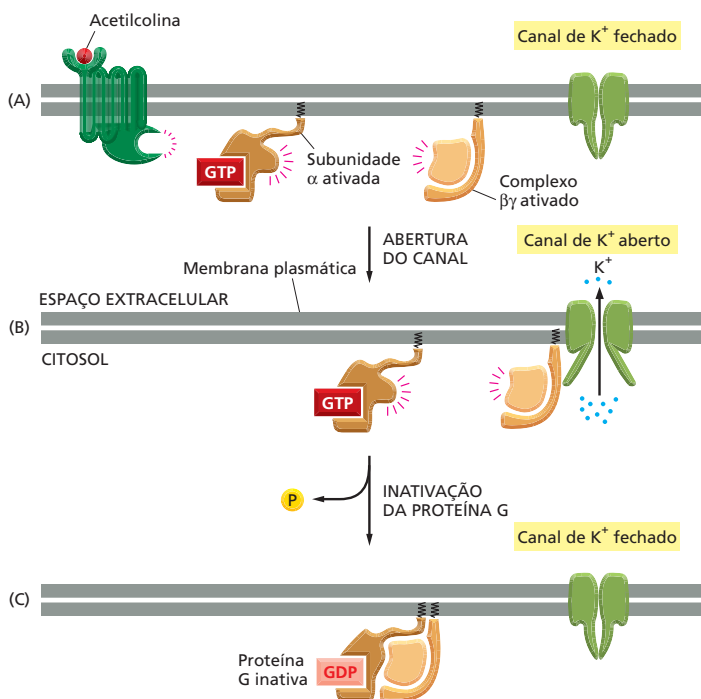
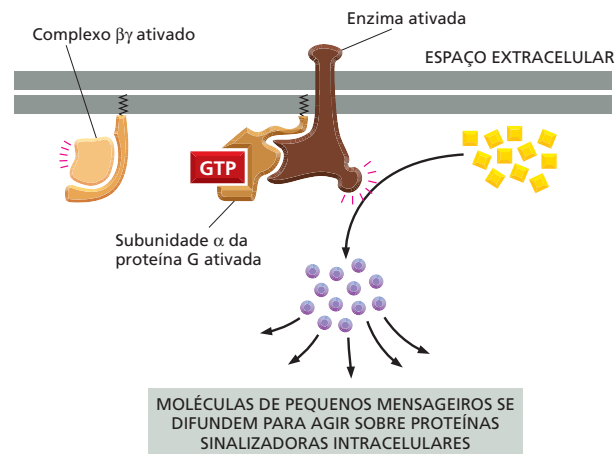



Figura 16-19 Uma proteína G acopla a ativação do receptor à abertura de canais de K^+ na membrana plasmática de uma célula muscular cardíaca. (A) A ligação do neurotransmissor acetilcolina ao seu receptor associado à proteína G na célula muscular cardíaca resulta na ativação da G_i. (B) O complexo βγ ativado se liga aos canais de K^+ na membrana plasmática da célula cardíaca permitindo a saída dos íons K^+ e reduzindo, assim, a excitabilidade celular. (C) A inativação da subunidade α pela hidrólise do seu GTP faz com que a proteína G retorne ao seu estado inativo, o que permite o fechamento do canal de K^+.

Figura 16-20 Enzimas ativadas por proteínas G catalisam a síntese de moléculas sinalizadoras intracelulares pequenas. Como cada enzima ativada gera muitas moléculas desses pequenos mensageiros, o sinal é muito amplificado nessa etapa da via. O sinal é passado adiante pelas pequenas moléculas mensageiras que se ligam a proteínas sinalizadoras específicas na célula e influenciam suas atividades.

sequências mais complexas, provocando a produção de moléculas sinalizadoras intracelulares adicionais. As duas enzimas-alvo mais frequentes das proteínas G são a *adenilato-ciclase,* a enzima responsável pela síntese do *AMP cíclico,* uma molécula sinalizadora intracelular pequena, e a *fosfolipase C,* responsável pela síntese das pequenas moléculas sinalizadoras intracelulares *trifosfato de inositol* e *diacilglicerol.* Essas duas enzimas são ativadas por tipos diferentes de proteínas, de maneira que as células são capazes de acoplar a produção das pequenas moléculas sinalizadoras intracelulares a sinais extracelulares diferentes. Conforme vimos, o acoplamento pode ser tanto estimulatório como inibitório. Concentraremo-nos aqui nas proteínas G que estimulam a atividade enzimática. As pequenas moléculas sinalizadoras intracelulares geradas nessas cascatas são frequentemente chamadas de **mensageiros pequenos** ou **segundos mensageiros** (os "primeiros mensageiros" são os sinais extracelulares). Eles são produzidos em grande quantidade quando as enzimas – a adenilato-ciclase ou a fosfolipase C – são ativadas, e eles se difundem rapidamente, disseminando o sinal por toda a célula (Figura 16-20).

Pequenos mensageiros diferentes produzem respostas diferentes. Examinaremos, em primeiro lugar, as consequências de um aumento nas concentrações intracelulares do AMP cíclico. Isso nos levará a um dos principais tipos de vias de sinalização iniciados pelos receptores associados às proteínas G. A seguir, discutiremos os efeitos do trifosfato de inositol e do diacilglicerol – moléculas mensageiras pequenas que nos levarão a uma via de sinalização diferente.

A via do AMP cíclico pode ativar enzimas e genes

Muitos sinais extracelulares que atuam por meio de receptores associados à proteína G afetam a atividade da **adenilato-ciclase** e alteram, portanto, a concentração intracelular da pequena molécula mensageira **AMP cíclico**. A subunidade α da proteína G estimulada ativa a adenilato-ciclase, causando um aumento súbito e dramático na síntese do AMP cíclico a partir de ATP (que está sempre presente na célula). Essa proteína G é denominada G_s porque estimula a ciclase. Uma segunda enzima, denominada *fosfodiesterase do AMP cíclico,* converte rapidamente o AMP cíclico em AMP para ajudar a eliminar o sinal (Figura 16-21). Um dos modos de atuação da cafeína como estimulante é pela inibição da fosfo-

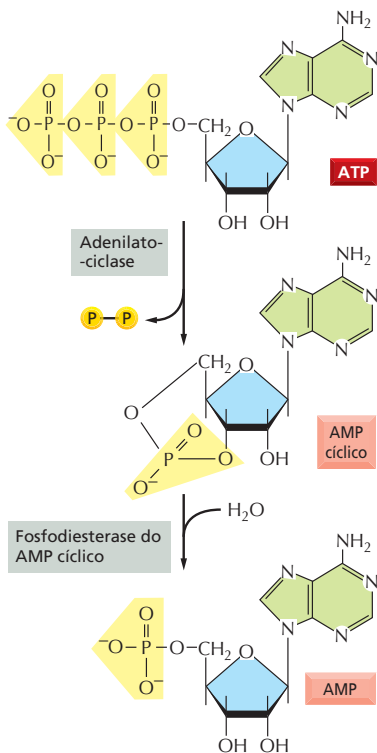



Figura 16-21 O AMP cíclico é sintetizado pela adenilato-ciclase e degradado pela fosfodiesterase do AMP cíclico. O AMP cíclico (também chamado de cAMP) é formado a partir de ATP por uma reação de ciclização que remove dois grupos fosfato do substrato e reúne as extremidades "livres" do grupo fosfato remanescente ao açúcar da molécula de ATP. A reação de degradação quebra essa segunda ligação, formando AMP.

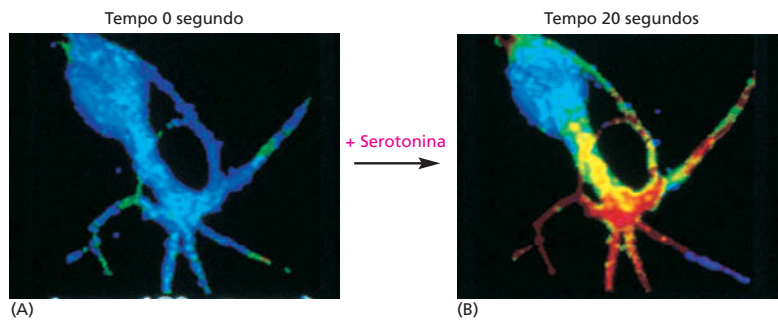



Figura 16-22 A concentração do AMP cíclico aumenta rapidamente em resposta a um sinal extracelular. Uma célula nervosa em cultura responde à ligação do neurotransmissor serotonina ao receptor associado à proteína G, sintetizando AMP cíclico. A concentração intracelular do AMP cíclico foi monitorada pela injeção, na célula, de uma proteína fluorescente cuja fluorescência muda quando ela se liga ao mensageiro. *Azul* indica um baixo nível de AMP cíclico, *amarelo* indica um nível intermediário, e *vermelho*, um alto nível. (A) Na célula em repouso, a concentração de AMP cíclico é de 5 x 10^{-8}M. (B) Vinte segundos após a adição de serotonina ao meio de cultura, a concentração de AMP cíclico aumenta mais de 20 vezes (para > 10^{-6}M) nas regiões da célula onde estão concentrados os receptores do neurotransmissor. (Cortesia de Roger Tsien.)

diesterase no sistema nervoso, bloqueando a degradação do AMP cíclico, o que mantém alta a concentração intracelular desse pequeno mensageiro.

A fosfodiesterase do AMP cíclico está permanentemente ativa dentro da célula. Em virtude da sua atividade de degradar rapidamente o AMP cíclico, as concentrações do mensageiro podem mudar também rapidamente em resposta ao sinal extracelular, aumentando ou diminuindo 10 vezes em poucos segundos (**Figura 16-22**). O AMP cíclico é uma molécula hidrossolúvel, podendo propagar o sinal por toda a célula, viajando a partir do sítio na membrana onde é sintetizado para interagir com proteínas localizadas no citosol, no núcleo, ou em outras organelas.

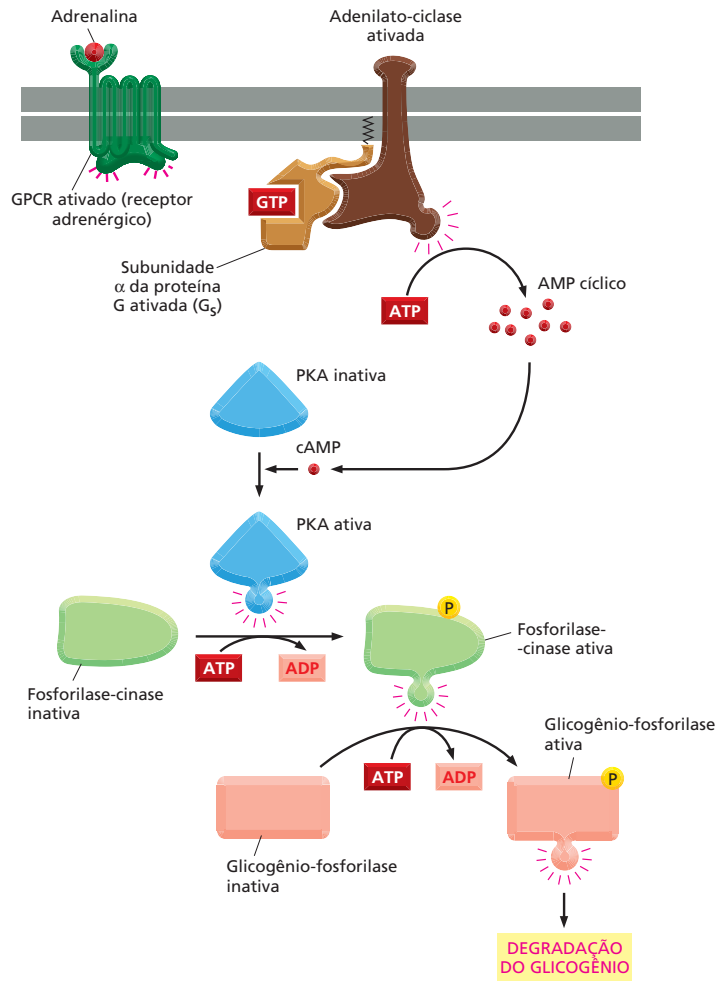
O AMP cíclico exerce esses vários efeitos principalmente pela ativação da enzima **proteína-cinase dependente de AMP cíclico** (**PKA**). Essa enzima é, normalmente, mantida inativa na forma de um complexo com outra proteína. A ligação do AMP cíclico força uma mudança conformacional que libera a cinase ativa. A PKA ativada catalisa a fosforilação de serinas e treoninas específicas em determinadas proteínas intracelulares, alterando, assim, suas atividades. Em tipos celulares diferentes, grupos diferentes de proteínas estão disponíveis para serem fosforilados, o que explica por que os efeitos do AMP cíclico variam com o tipo de célula-alvo.

Muitas respostas celulares são mediadas pelo AMP cíclico; algumas estão listadas na **Tabela 16-3**. Como a tabela mostra, células-alvo diferentes respondem de modo muito diferente a sinais extracelulares que alteram a concentração intracelular do mensageiro. Quando estamos amedrontados ou excitados, por exemplo, a glândula adrenal libera o hormônio *adrenalina,* que circula na corrente sanguínea e se liga a receptores associados à proteína G (receptores adrenérgicos) que estão presentes em muitos tipos de células. As consequências variam de uma célula para outra, mas todas as respostas ajudam o corpo a se preparar para uma ação rápida. No músculo esquelético, por exemplo, a adrenalina desencadeia um aumento na concentração intracelular de AMP cíclico, o que causa a degradação do glicogênio – o estoque de glicose em forma de polímero. Isso é feito pela ativação da PKA que leva à ativação de uma enzima que promove a degradação do glicogênio (**Figura 16-23**) e à inibição de uma que aciona a

TABELA 16-3 Algumas respostas celulares mediadas pelo AMP cíclico

Molécula-sinal extracelular*	Tecido-alvo	Resposta principal
Adrenalina	Coração	Aumento do ritmo cardíaco e da força de contração
Adrenalina	Músculo esquelético	Degradação do glicogênio
Adrenalina, ACTH, glucagon	Tecido adiposo	Degradação de gordura
ACTH	Glândula adrenal	Secreção de cortisol

*Embora todas as moléculas-sinal relacionadas aqui sejam hormônios, o AMP cíclico também faz a mediação de algumas respostas a mediadores locais e neurotransmissores.

Figura 16-23 A adrenalina estimula a degradação do glicogênio nas células da musculatura esquelética. O hormônio ativa um receptor associado à proteína G que, por sua vez, ativa uma proteína G (G_s), a qual ativa a adenilato-ciclase, impulsionando a produção de AMP cíclico. Esse, por sua vez, ativa PKA, que fosforila e ativa uma enzima chamada de fosforilase-cinase. Essa cinase ativa a glicogênio-fosforilase, a enzima que degrada o glicogênio. Essas reações ocorrem rapidamente, pois não envolvem mudanças na transcrição gênica nem síntese de novas proteínas.

QUESTÃO 16-6

Explique por que, para permitir uma sinalização rápida, o AMP cíclico tem de ser degradado rapidamente dentro da célula.

síntese do mesmo. Pelo fato de estimular a degradação do glicogênio e inibir sua síntese, o aumento de AMP cíclico aumenta ao máximo a quantidade de glicose disponível como combustível para acelerar a atividade muscular. A adrenalina também age sobre as células adiposas, estimulando a degradação dos triacilgliceróis (a forma de reserva das gorduras) a ácidos graxos – uma forma de combustível celular de uso imediato (discutido no Capítulo 13), que também pode ser exportada para outras células que necessitem de energia.

Em alguns casos, os efeitos da ativação da cascata do AMP cíclico são rápidos; por exemplo, no músculo esquelético, a degradação do glicogênio ocorre em alguns segundos após a ligação da adrenalina ao seu receptor (ver Figura 16-23). Em outros casos, as respostas ao AMP cíclico envolvem mudanças na expressão gênica que demoram minutos ou horas para acontecer (ver Figura 16-7). Nessas respostas lentas, a PKA fosforila reguladores de transcrição que ativam a transcrição de genes selecionados. Nas células endócrinas do hipotálamo, por exemplo, um aumento na concentração do AMP cíclico estimula a síntese de um hormônio peptídico denominado somatostatina, que então suprime a liberação de vários hormônios por outras células. Da mesma forma, aumentos na concentração do mensageiro em alguns neurônios do cérebro controlam a síntese de proteínas envolvidas em algumas formas de aprendizagem. A **Figura 16-24** mostra uma típica via mediada por AMP desde a membrana plasmática até o núcleo.

Voltaremos agora à outra cascata de sinalização mediada por enzimas iniciada por receptores associados à proteína G – a via que inicia com a ativação

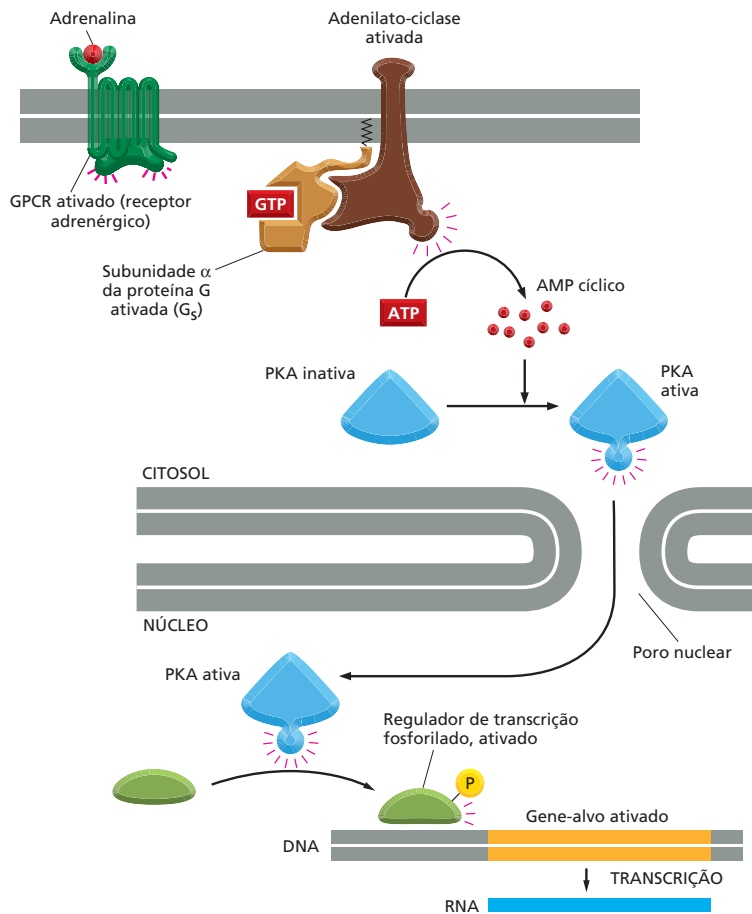



Figura 16-24 Um aumento no AMP cíclico intracelular pode ativar a transcrição gênica. A ligação de uma molécula-sinal ao seu receptor associado à proteína G pode levar à ativação da adenilato-ciclase e a um aumento na concentração intracelular de AMP cíclico. No citosol, o AMP cíclico ativa PKA, a qual se desloca para o núcleo e fosforila reguladores de transcrição específicos. Essas proteínas, quando fosforiladas, estimulam a transcrição de um conjunto completo de genes-alvo (**Animação 16.3**). Esse tipo de via de sinalização controla muitos processos celulares, desde a síntese de hormônios pelas células endócrinas até a síntese de proteínas envolvidas com a memória de longa duração no cérebro. A PKA ativada também pode fosforilar e, dessa forma, promover a regulação de outras proteínas e enzimas no citosol (como é mostrado na Figura 16-23).

da enzima *fosfolipase C,* ligada à membrana, e gera os segundos mensageiros, *trifosfato de inositol* e *diacilglicerol.*

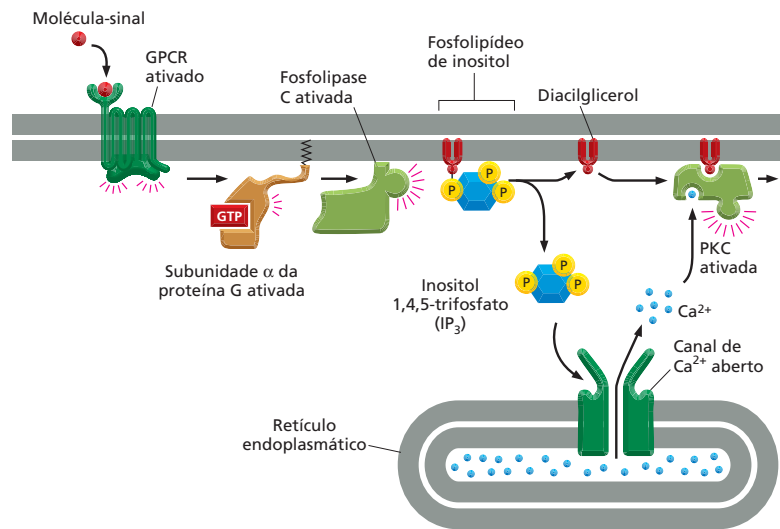
A via do fosfolipídeo de inositol desencadeia um aumento no Ca^{2+} intracelular

Alguns GPCRs exercem seus efeitos por meio de proteínas G que ativam a enzima **fosfolipase C**, em vez da adenilato-ciclase. A Tabela 16-4 apresenta vários exemplos.

A fosfolipase C, uma vez ativada, propaga o sinal pela degradação de uma molécula lipídica que é um componente da membrana plasmática. A molécula é um **fosfolipídeo de inositol** (um fosfolipídeo que contém o açúcar inositol ligado à sua cabeça) que está presente em pequenas quantidades na face citosó-

TABELA 16-4 Algumas respostas celulares mediadas pela ativação da fosfolipase C

Molécula-sinal	Tecido-alvo	Resposta principal
Vasopressina (hormônio peptídico)	Fígado	Degradação do glicogênio
Acetilcolina	Pâncreas	Secreção de amilase (enzima digestória)
Acetilcolina	Músculo liso	Contração
Trombina (enzima proteolítica)	Plaquetas sanguíneas	Agregação

Figura 16-25 A fosfolipase C ativa duas vias de sinalização. A hidrólise de um fosfolipídeo de inositol de membrana por uma fosfolipase C ativada produz duas moléculas mensageiras pequenas. O inositol 1,4,5- trisfosfato (IP_3) se difunde pelo citosol e se liga aos canais especiais de Ca^{2+} na membrana do retículo endoplasmático, abrindo-os e desencadeando a liberação do íon. O gradiente eletroquímico grande faz com que o Ca^{2+} saia rapidamente para o citosol. O diacilglicerol permanece na membrana e, juntamente com o Ca^{2+}, auxilia na ativação da proteína-cinase C (PKC), que é recrutada do citosol para a face citosólica da membrana plasmática. A PKC fosforila seu próprio conjunto de proteínas-alvo intracelulares, propagando o sinal.

lica da bicamada lipídica da membrana plasmática (ver Figura 11-17). Em virtude do envolvimento desse composto, a via de sinalização que inicia com a ativação da fosfolipase C é conhecida como a *via do fosfolipídeo de inositol.* Essa cascata de sinalização ocorre em quase todas as células eucarióticas e regula muitas proteínas efetoras diferentes.

A cascata funciona da seguinte maneira: quando a fosfolipase C remove o açúcar-fosfato do fosfolipídeo de inositol, ela gera duas pequenas moléculas sinalizadoras – **inositol 1,4,5-trifosfato** (**IP_3**) e **diacilglicerol** (**DAG**). O IP_3, um açúcar fosforilado hidrofílico, difunde-se para o citosol, e o lipídeo diacilglicerol permanece na membrana plasmática. Ambas as moléculas têm uma atuação crucial na transmissão do sinal dentro da célula; a seguir, elas serão estudadas.

O IP_3 liberado no citosol chega rapidamente ao retículo endoplasmático, onde se liga aos canais de Ca^{2+} na membrana da organela, abrindo-os. O Ca^{2+}, armazenado dentro do retículo, é então liberado para o citosol por meio desses canais abertos (Figura 16-25), causando um acentuado aumento na concentração citoplasmática do íon livre, a qual é, normalmente, muito baixa. Esse Ca^{2+}, por sua vez sinaliza para outras proteínas, conforme será discutido a seguir.

O diacilglicerol que é gerado junto com o IP_3 auxilia no recrutamento e na ativação de uma proteína-cinase, que se transloca do citosol para a membrana plasmática. Essa enzima é denominada **proteína-cinase C** (**PKC**) porque ela também precisa ligar-se ao Ca^{2+} para se tornar ativa (ver Figura 16-25). A PKC, uma vez ativada, fosforila um conjunto de proteínas intracelulares que variam dependendo do tipo celular. A PKC tem o mesmo mecanismo de ação da PKA, embora a maioria das proteínas que ela fosforila sejam diferentes.

Um sinal de Ca^{2+} desencadeia muitos processos biológicos

O Ca^{2+} tem uma atuação tão generalizada e importante como pequeno mensageiro intracelular que temos de fazer uma digressão para considerar suas funções de uma forma mais geral. Uma alteração na concentração citosólica de Ca^{2+} livre é desencadeada por muitos tipos de estímulos, não somente por aqueles que agem por meio de receptores associados à proteína G. Quando um espermatozoide fertiliza um óvulo, por exemplo, os canais de Ca^{2+} se abrem, e o consequente aumento no Ca^{2+} citosólico desencadeia o início do desenvolvimento embrionário (Figura 16-26). No caso das células musculares esqueléticas, um sinal do nervo desencadeia um aumento do Ca^{2+} citosólico que inicia a contração. Em muitas células secretoras, incluindo as células nervosas, o Ca^{2+} desencadeia a secreção. O Ca^{2+} estimula todas essas respostas porque se liga a proteínas sensíveis a ele e influencia suas atividades.

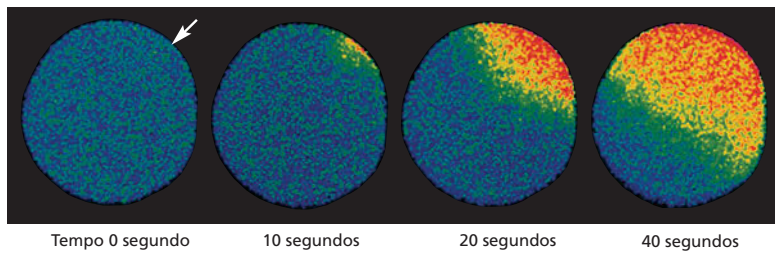



Figura 16-26 A fertilização de um óvulo por um espermatozoide desencadeia um aumento do Ca^{2+} citosólico no óvulo. Esse óvulo de estrela-do-mar foi injetado com um corante fluorescente sensível ao Ca^{2+} antes de ser fertilizado. Quando o espermatozoide penetra no óvulo, uma onda de Ca^{2+} (*vermelho*) citosólico – liberado do retículo endoplasmático – flui por todo o óvulo partindo do local de entrada do espermatozoide (*seta*). Essa onda de Ca^{2+} provoca uma mudança na superfície do óvulo (agora ovo), impedindo a entrada de outro espermatozoide, e inicia o desenvolvimento embrionário. Veja **Animação 16.4** para captar essa onda de Ca^{2+}. (Cortesia de Stephen A. Stricker.)

A concentração de Ca^{2+} livre no citosol de uma célula não estimulada é extremamente baixa (10^{-7}M) comparada com sua concentração no líquido extracelular ou no retículo endoplasmático. Essas diferenças são mantidas por bombas, inseridas nas membranas, que bombeiam ativamente o Ca^{2+} para fora do citosol – para dentro do retículo endoplasmático ou, pela membrana plasmática, para fora da célula. Como resultado, existe um alto gradiente eletroquímico de Ca^{2+} através da membrana do retículo endoplasmático e da membrana plasmática (discutido no Capítulo 12). Quando um sinal abre, transitoriamente, os canais de Ca^{2+} em uma dessas membranas, o íon se desloca rapidamente para o citosol a favor de seu gradiente de concentração e desencadeia mudanças nas proteínas sensíveis a ele. As mesmas bombas que atuam na manutenção das concentrações citosólicas de Ca^{2+} baixas também auxiliam na extinção do sinal de Ca^{2+}.

Os efeitos do Ca^{2+} no citosol são, basicamente, indiretos: eles são mediados por meio da interação do íon com vários tipos de *proteínas de resposta a* Ca^{2+}. A mais comum e mais difundida delas é a **calmodulina**. Essa proteína está presente no citosol de todas as células eucarióticas estudadas até agora, inclusive em plantas, fungos e protozoários. A ligação da calmodulina ao Ca^{2+} induz uma mudança de conformação na proteína que a torna capaz de se enrolar ao redor de uma ampla gama de proteínas-alvo na célula e alterar suas atividades (**Figura 16-27**). Uma classe particularmente importante de alvos da calmodulina é a das **proteína-cinases dependentes de Ca^{2+}/calmodulina (CaM-cinases)**. Quando são ativadas pela ligação ao Ca^{2+} complexado com a calmodulina, essas proteínas influenciam outros processos na célula pela fosforilação de proteínas específicas. No cérebro de mamíferos, por exemplo, existe uma CaM-cinase específica de neurônios que é abundante nas sinapses, onde se imagina que tenha uma função no aprendizado e na memória. Essa CaM-cinase é ativada pelos pulsos de sinais de Ca^{2+} que acontecem durante a atividade neural, e camundongos mutantes que não possuem a enzima mostram uma incapacidade marcante de lembrar onde as coisas estão.

QUESTÃO 16-7

Por que você supõe que as células desenvolveram estoques intracelulares de Ca^{2+} para sinalização mesmo com a existência de grande quantidade de Ca^{2+} extracelular?

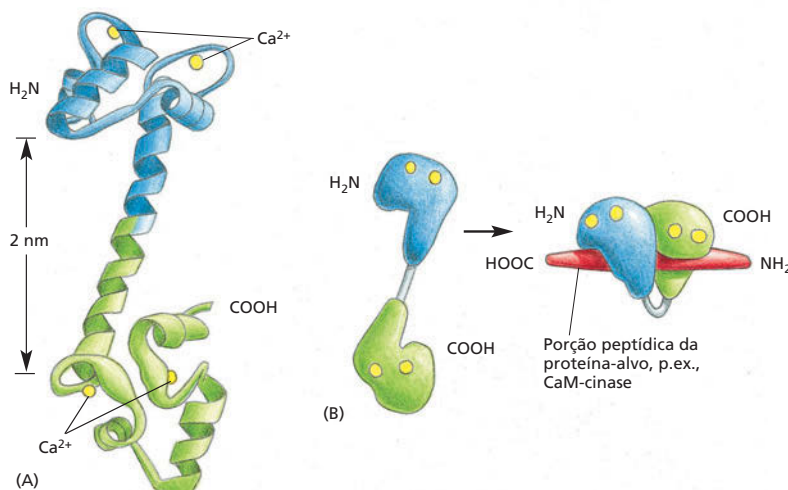



Figura 16-27 A ligação do cálcio altera a forma da proteína calmodulina. (A) A molécula de calmodulina tem a forma de um haltere, com duas extremidades globulares conectadas por uma α-hélice longa e flexível. Cada extremidade tem dois domínios de ligação ao Ca^{2+}. (B) Representação simplificada da estrutura, mostrando as mudanças conformacionais na Ca^{2+}/calmodulina quando se liga a uma proteína-alvo. Note que a α-hélice se dobra ao redor da proteína-alvo (**Animação 16.5**). (A, de Y.S. Babu *et al.*, *Nature* 315:37-40, 1985. Com permissão de Macmillan Publishers, Ltd.; B, de W.E. Meador, A.R. Means e F.A. Quiocho, *Science* 257:1251-1255, 1992, e M. Ikura *et al.*, *Science* 256:632-638, 1992. Com permissão de AAAS.)

Figura 16-28 Uma célula fotorreceptora (bastonete) da retina é intensamente sensível à luz. Desenho de um bastonete fotorreceptor. As moléculas de rodopsina que absorvem a luz estão inseridas em muitas vesículas de membrana em forma de panqueca (*discos*) dentro do segmento externo da célula. O neurotransmissor é liberado pela extremidade oposta da célula para controlar a descarga das células nervosas da retina que passam o sinal para o cérebro. Quando o bastonete é estimulado pela luz, é transmitido um sinal a partir das moléculas de rodopsina nos discos, por meio do citosol do segmento externo, para canais de Na^+ na membrana plasmática desse segmento. Os canais de Na^+ se fecham em resposta a esse sinal, gerando uma mudança no potencial de membrana do bastonete. Por mecanismos semelhantes aos que controlam a liberação do neurotransmissor nas células nervosas comuns, a mudança do potencial de membrana altera a taxa de liberação do neurotransmissor na região sináptica da célula. (Adaptada de T.L. Lentz, Cell Fine Structure. Filadélfia: Saunders, 1971. Com permissão da Elsevier.)

As cascatas de sinalização intracelular podem alcançar velocidades, sensibilidades e adaptabilidades surpreendentes

As etapas das *cascatas de sinalização* conectadas aos receptores associados à proteína G levam tempo para serem descritas, mas frequentemente demoram somente alguns segundos para serem executadas. Considere a rapidez com que uma emoção pode fazer seu coração bater mais rapidamente (quando a adrenalina estimula os receptores associados à proteína G nas suas células musculares cardíacas, acelerando os batimentos do coração), ou a rapidez com que o aroma de um alimento pode fazer você salivar (por meio de receptores de acetilcolina associados à proteína G nas células salivares, que estimulam a secreção). Entre a mais rápida de todas as respostas mediadas por um receptor associado à proteína G, no entanto, está a resposta do olho à luz: demora somente 20 ms para que as mais rápidas células fotorreceptoras da retina (os cones, fotorreceptores responsáveis pela visão colorida no claro) produzam sua resposta elétrica a um súbito clarão de luz.

Essa velocidade é alcançada apesar da necessidade de transmitir o sinal por várias etapas de uma cascata de sinalização intracelular. Os fotorreceptores também proporcionam um belo exemplo das vantagens positivas das cascatas de sinalização: tais cascatas permitem uma espetacular amplificação do sinal inicial e consentem que as células se adaptem para serem capazes de detectar sinais de intensidade muito variada. Os detalhes quantitativos foram totalmente analisados para os bastonetes do olho, os fotorreceptores que são responsáveis pela visão não colorida no escuro (**Figura 16-28**). Nessas células, a luz é captada pela *rodopsina,* um receptor de luz associado à proteína G. A rodopsina estimulada pela luz ativa uma proteína G chamada de *transducina.* Sua subunidade α ativada inicia uma cascata de sinalização intracelular que causa o fechamento dos canais de cátions na membrana plasmática da célula fotorreceptora. Isso gera uma mudança no potencial de membrana, cuja consequência é o envio de um impulso nervoso para o cérebro.

O sinal é amplificado repetidamente, à medida que é transmitido ao longo dessa via de sinalização (**Figura 16-29**). Quando as condições de iluminação são fracas, como em uma noite sem luar, a amplificação é enorme, e apenas uma dúzia de fótons absorvidos pela retina faz com que um sinal perceptível seja enviado para o cérebro. Sob a luz do sol, quando os fótons inundam cada célula fotorreceptora a uma velocidade de bilhões por segundo, a cascata de sinalização se *adapta,* reduzindo a amplificação em mais de 10.000 vezes. Dessa forma, as células não são sobrecarregadas e podem registrar aumentos e reduções na intensidade da luz. A adaptação depende de uma retroalimentação negativa: uma resposta intensa da célula fotorreceptora gera um sinal intracelular (uma alteração na concentração do Ca^{2+}) que inibe as enzimas responsáveis pela amplificação do sinal.

A **adaptação** também acontece nas vias de sinalização que respondem aos sinais químicos. Ela permite que as células permaneçam sensíveis às mu-

danças na intensidade do sinal dentro de um amplo espectro de níveis basais de estimulação. Em outras palavras, a adaptação permite à célula responder tanto às mensagens sussurradas quanto às gritadas.

O olfato e o gosto também dependem de receptores associados à proteína G. Parece provável que esse mecanismo de recepção de sinal, inventado bem cedo na evolução dos eucariotos, tenha sua origem na necessidade básica e universal das células em sentir seu meio ambiente e responder a ele. Certamente os receptores associados à proteína G não são os únicos que ativam cascatas de sinalização intracelular. Vamos agora nos concentrar em outra classe de receptores de superfície celular – receptores associados a enzimas – que têm um papel-chave no controle do número de células, na diferenciação celular e no movimento celular dos animais multicelulares.

Figura 16-29 A cascata de sinalização induzida por luz nas células fotorreceptoras (bastonetes) amplificam muito o sinal luminoso. Quando os bastonetes estão adaptados para luz de fraca intensidade, a amplificação do sinal é enorme. A via de sinalização intracelular iniciada pela proteína G transducina usa componentes que diferem dos previamente descritos. A cascata funciona da seguinte forma: na ausência de um sinal luminoso, a molécula mensageira GMP cíclico é continuamente produzida pela guanilato-ciclase (ver Figura 16-11C) na célula fotorreceptora e se liga aos canais de cátions na membrana plasmática, mantendo-os abertos. A ativação da rodopsina pela luz resulta na ativação de subunidades α de transducina. Essas ativam uma enzima chamada de fosfodiesterase do GMP cíclico que o degrada a GMP (assim como a fosfodiesterase do AMP cíclico degrada o AMP, ver Figura 16-21). A queda brusca na concentração intracelular de GMP cíclico faz com que essa molécula se dissocie dos canais de cátions, os quais se fecham. As *setas vermelhas* indicam as etapas onde ocorrem as amplificações, e a espessura das setas indica aproximadamente a magnitude da amplificação.

RECEPTORES ASSOCIADOS A ENZIMAS

Tal como os receptores associados à proteína G, os **receptores associados a enzimas** são proteínas transmembrana com seus domínios de interação ao ligante expostos na superfície externa da membrana plasmática. No entanto, em vez de se associar a uma proteína G, o domínio citoplasmático do receptor atua como uma enzima – ou forma um complexo com outra proteína com atividade enzimática. Os receptores associados a enzimas (ver Figura 16-15C) foram descobertos em função do seu papel em resposta às proteínas-sinal extracelulares ("fatores de crescimento") que regulam crescimento, proliferação, diferenciação e sobrevivência das células nos tecidos animais (ver exemplos na Tabela 16-1, p. 535). A maioria dessas proteínas-sinal funciona como mediadores locais e podem agir em concentrações muito baixas (10^{-9} a 10^{-11}M). As respostas a elas são geralmente lentas (em um período de horas) e requerem muitas etapas de transdução intracelular que no final produzem mudanças na expressão gênica.

Os receptores associados a enzimas, contudo, podem mediar reconfigurações rápidas e diretas do citoesqueleto, controlando a maneira pela qual a célula altera sua forma e se move. Os sinais extracelulares que levam a essas alterações na arquitetura celular são, com frequência, proteínas de sinalização não difusíveis, estando aderidas à superfície sobre a qual a célula se desloca. Os distúrbios de crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência e migração celular são fundamentais no câncer, e as anormalidades na sinalização por receptores associados a enzimas têm um importante papel no desenvolvimento dessa classe de doença.

A maior classe de receptores associados a enzimas é formada por aqueles que têm um domínio citoplasmático que funciona como uma tirosina-cinase, que fosforila cadeias laterais de tirosinas de proteínas intracelulares específicas. Tais receptores são denominados **receptores tirosina-cinase** (**RTKs**) e serão focalizados a seguir. Observe que todas as demais proteína-cinases que apresentamos até aqui – incluindo PKA, PKC e CaM-cinases – são serina/treonina-cinases.

Receptores tirosina-cinase ativados agregam um complexo de proteínas sinalizadoras intracelulares

Para funcionar como um transdutor de sinal, um receptor associado a enzimas tem de acionar a atividade enzimática de seu domínio intracelular (ou de uma enzima associada) quando uma molécula-sinal se liga ao seu domínio extracelular. Diferentemente dos receptores associados à proteína G, que atravessam a membrana sete vezes, as proteínas que formam os receptores associados a enzimas têm somente um segmento transmembrana, o qual se acredita que atravesse a bicamada lipídica como uma única α-hélice. Aparentemente não há como induzir uma mudança conformacional em uma única α-hélice, de modo que esses receptores têm uma estratégia diferente para transduzir o sinal extracelular.

QUESTÃO 16-8

Uma característica importante de qualquer via de sinalização intracelular é sua capacidade de se desligar. Considere a via mostrada na Figura 16-29. Onde são necessários interruptores? Quais, em sua opinião, são os mais importantes?

Em muitos casos, a ligação de uma molécula-sinal faz com que dois receptores se reúnam na membrana, formando um dímero. O contato entre as caudas dos dois receptores intracelulares adjacentes ativa sua função de cinase, tendo como resultado a fosforilação mútua. No caso dos receptores tirosina-cinase, as fosforilações acontecem em tirosinas específicas localizadas nas suas caudas citosólicas.

A fosforilação das tirosinas desencadeia a agregação de um elaborado complexo de sinalização intracelular nas caudas do receptor. As tirosinas fosforiladas servem como sítios de ligação para toda uma fauna de proteínas sinalizadoras intracelulares – talvez de 10 a 20 moléculas diferentes –, as quais podem tornar-se ativadas após a ligação (**Figura 16-30**). Algumas dessas proteínas são fosforiladas e se tornam ativas ao interagirem com o receptor, propagando, então, o sinal; outras atuam somente como *adaptadores,* que acoplam o receptor a outras proteínas sinalizadoras, ajudando, dessa forma, na formação de um complexo de sinalização ativo. Todas essas proteínas de sinalização intracelular possuem um domínio de interação especializado, capaz de reconhecer tirosinas fosforiladas específicas. Domínios similares permitem às proteínas sinalizadoras reconhecer os lipídeos fosforilados que são produzidos na membrana em resposta a determinados sinais, conforme veremos mais adiante.

Enquanto persistem, esses complexos proteicos formados nas caudas citosólicas dos receptores tirosina-cinase transmitem o sinal ao longo de várias rotas simultaneamente para muitos destinos dentro da célula, e, dessa forma, ativam e coordenam as numerosas mudanças bioquímicas necessárias para desencadear uma resposta complexa como a proliferação celular. As fosforilações nas tirosinas são revertidas pelas *proteínas-tirosina-fosfatases,* que removem os fosfatos que foram adicionados às tirosinas dos receptores tirosina-cinase e a outras proteínas sinalizadoras em resposta ao sinal extracelular, o que ajuda a extinguir a resposta. Em alguns casos, os receptores tirosina-cinase (e os GPCRs) são desativados de uma maneira mais drástica: eles são arrastados para o interior da célula por endocitose e destruídos, por digestão, nos lisossomos.

Receptores tirosina-cinase diferentes recrutam grupos distintos de proteínas sinalizadoras intracelulares, produzindo diferentes efeitos. Determinados componentes, no entanto, parecem ser usados na maioria dos receptores tirosina-cinase. Entre eles está, por exemplo, uma fosfolipase que funciona da mesma maneira que a fosfolipase C ativada pelos GPCRs na ativação da vias de sinalização do fosfolipídeo de inositol (ver Figura 16-25). Outra proteína sinalizadora intracelular ativada por quase todos os receptores tirosina-cinase é a pequena proteína de ligação a GTP denominada Ras.

A maioria dos receptores tirosina-cinase ativam a GTPase monomérica Ras

Conforme discutimos, receptores tirosina-cinase ativados recrutam muitos tipos de proteínas sinalizadoras intracelulares e formam grandes complexos de sinalização. Um dos componentes-chave nesses complexos é a **Ras** – uma pequena proteína ligada à face citoplasmática da membrana por uma cauda lipídica. Pra-

Figura 16-30 **A ativação de um receptor tirosina-cinase (RTK) estimula a montagem de um complexo de sinalização intracelular.** A ligação de uma molécula-sinal ao domínio extracelular de um receptor tirosina-cinase provoca a associação de dois receptores formando um dímero. A própria molécula-sinal mostrada aqui é um dímero e, por isso, pode fazer uma ligação cruzada com duas moléculas do receptor. Em outros casos, a ligação da molécula-sinal altera de tal forma a conformação dos receptores que eles dimerizam. A formação do dímero propicia o contato dos domínios de cinase das caudas intracelulares dos receptores. Isso ativa as cinases e permite a fosforilação recíproca em várias cadeias laterais de tirosinas. Cada tirosina fosforilada serve como um sítio específico de ligação para uma proteína sinalizadora intracelular diferente que auxilia na propagação do sinal para o interior da célula. Essas proteínas possuem um domínio de interação especializado – nesse caso, um módulo chamado de domínio SH2 – que reconhece e se liga a tirosinas fosforiladas específicas em um receptor ativado ou em outra proteína sinalizadora intracelular.

Figura 16-31 Receptores tirosina-cinases ativam Ras. Uma proteína adaptadora ancora em uma fosfotirosina específica no receptor ativado (para simplificar, as outras proteínas sinalizadoras que são mostradas ligadas ao receptor na Figura 16-30 estão omitidas). O adaptador recruta e estimula uma proteína ativadora de Ras que estimula a Ras a trocar seu GDP por um GTP. A Ras ativada estimula então várias vias de sinalização, uma das quais é mostrada na Figura 16-32. Note que a proteína Ras contém um grupo lipídico covalentemente ligado (*preto*) que auxilia na ancoragem da proteína à membrana plasmática.

ticamente todos os receptores tirosina-cinase ativam Ras, desde o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que medeia a proliferação celular na cicatrização de feridas, até o receptor do fator de crescimento do nervo (NGF), que impede a morte de determinados neurônios durante o desenvolvimento do sistema nervoso.

A proteína Ras pertence a uma grande família de proteínas ligadoras de GTP, pequenas e formadas por uma única cadeia polipeptídica, frequentemente denominadas **GTPases monoméricas**, para distingui-las das proteínas G triméricas que foram descritas anteriormente. A Ras se assemelha à subunidade α de uma proteína G e também funciona como um interruptor molecular. Ela alterna entre dois estados conformacionais distintos – ativa quando ligada a GTP e inativa quando ligada a GDP (ver Figura 16-14B). A interação com uma proteína sinalizadora ativada faz com que a Ras troque seu GDP por um GTP, tornando-se ativa (**Figura 16-31**). Após algum tempo, a própria Ras hidrolisa o GTP a GDP, tornando-se inativa (**Animação 16.6**).

Em seu estado ativado, a Ras promove a ativação de uma cascata de fosforilação, na qual uma série de serina/treonina-cinases fosforilam e ativam uma à outra em sequência, como se fosse um jogo de dominó molecular (**Figura 16-32**). Esse sistema de transmissão, que conduz o sinal da membrana plasmática para o núcleo, inclui um módulo de três proteína-cinases chamado de **módulo de sinalização da MAP-cinase**, em homenagem à última cinase da cadeia (**MAP-cinase**, de *mitogen-activated protein kinase,* ou seja, proteína cinase ativada por *mitógenos*, que são moléculas-sinal extracelulares que estimulam a proliferação celular). Nessa via, a MAP-cinase é fosforilada e ativada por uma

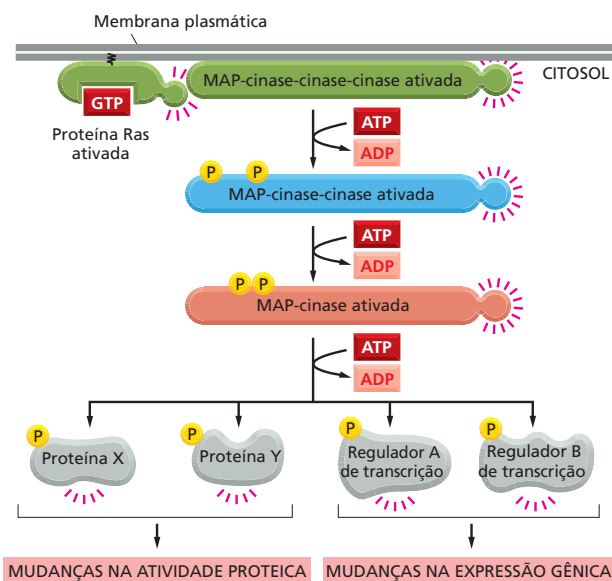



Figura 16-32 Ras ativa um módulo de sinalização da MAP-cinase. A proteína Ras ativada pelo processo mostrado na Figura 16-31 ativa um módulo de sinalização de três cinases, que propagam o sinal. A última cinase do módulo, a MAP-cinase, fosforila várias proteínas sinalizadoras ou efetoras à frente. Essas proteínas podem ser outras proteína-cinases e, o mais importante, reguladores de transcrição que controlam a expressão gênica. As mudanças resultantes na expressão de genes e na atividade de proteínas levam a alterações complexas no comportamento celular, como, por exemplo, na proliferação e na diferenciação.

enzima chamada de *MAP-cinase-cinase.* Essa enzima é, por sua vez, ativada por uma *MAP-cinase-cinase-cinase* (a qual é estimulada por Ras). No final da cascata, a MAP-cinase fosforila várias proteínas efetoras incluindo determinados reguladores de transcrição, alterando sua capacidade de controlar a transcrição gênica. Essa mudança no padrão de expressão gênica pode estimular a proliferação, promover a sobrevivência ou induzir a diferenciação celular. O resultado final vai depender de quais outros genes estão ativos na célula e que outros sinais a célula recebe. Nas páginas 560 à 561, em "**Como Sabemos**", está a descrição de como os pesquisadores elucidaram essas complexas cascatas de sinalização.

A importância da Ras tem sido demonstrada de várias formas. Por exemplo, se a proteína for inibida por uma injeção intracelular de anticorpos que a inativam, as células podem deixar de responder a alguns dos sinais extracelulares aos quais elas normalmente respondem. Ao contrário, se a Ras for mantida em ativação permanente em alguns tipos celulares, as células podem se comportar como se estivessem sendo bombardeadas continuamente por mitógenos extracelulares estimuladores de proliferação (discutido no Capítulo 18). Antes de ser descoberta em células normais, a proteína Ras foi encontrada em células cancerosas humanas; a mutação inativa a atividade GTPásica da Ras, de forma que a proteína não pode se autoinativar, o que causa a proliferação celular descontrolada e o desenvolvimento do câncer. Cerca de 30% dos cânceres humanos têm seus genes *Ras* com essas mutações ativadoras, e muitos cânceres que não produzem proteínas Ras mutantes têm mutações em genes cujos produtos estão na mesma via de sinalização da Ras. Muitos dos genes que codificam essas proteínas sinalizadoras intracelulares foram identificados inicialmente na procura por *oncogenes* promotores de câncer, discutidos no Capítulo 20.

QUESTÃO 16-9

Você esperaria ativar receptores ligados à proteína G e receptores tirosina-cinase pela exposição das células a anticorpos que se ligassem às respectivas proteínas? (Dica: ver Painel 4-3, p. 114-145, a respeito das propriedades dos anticorpos.)

Os receptores tirosina-cinase ativam a PI-3-cinase na produção de sítios lipídicos de ancoragem na membrana plasmática

Muitas proteínas-sinal extracelulares que estimulam a sobrevivência, o crescimento e a proliferação das células animais o fazem via receptores tirosina-cinase. Entre elas estão as proteínas-sinal pertencentes à família do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF, de *insuline-like Growth Factor)*. Uma via de sinalização extremamente importante ativada pelos receptores tirosina-cinase para promover o crescimento e a sobrevivência celular conta com a enzima **fosfoinositídeo-3-cinase** (**PI-3-cinase**), que fosforila fosfolipídeos de inositol na membrana plasmática. Esses se tornam então sítios de ancoragem para proteínas sinalizadoras intracelulares específicas, que são transferidas do citosol para a membrana plasmática, onde se ativam mutuamente.

Uma das mais importantes proteínas transferidas é a serina/treonina-cinase *Akt,* também chamada de *proteína-cinase B* ou *PKB* (**Figura 16-33**). Akt promove o crescimento e a sobrevivência de muitos tipos celulares, com frequência pela inativação das proteínas sinalizadoras fosforiladas por ela. Por exemplo,

Figura 16-33 Os receptores tirosina-cinases ativam a via de sinalização PI-3-cinase-Akt. Um sinal extracelular de sobrevivência, como IGF, ativa um receptor tirosina-cinase, que recruta e ativa a PI-3-cinase. Essa fosforila um fosfolipídeo de inositol associado à membrana. Proteínas sinalizadoras intracelulares que possuem um domínio especial que reconhece o fosfolipídeo de inositol fosforilado são atraídas por ele. Uma dessas proteínas é a Akt, uma proteína-cinase que é ativada, na membrana, por fosforilação mediada por outras duas proteína-cinases (chamadas aqui de proteína-cinases 1 e 2). A proteína-cinase 1 é recrutada também pelos sítios de ancoragem de lipídeos fosforilados. Quando ativada, a Akt é liberada da membrana plasmática e fosforila serinas e treoninas específicas de várias proteínas (não mostrado).

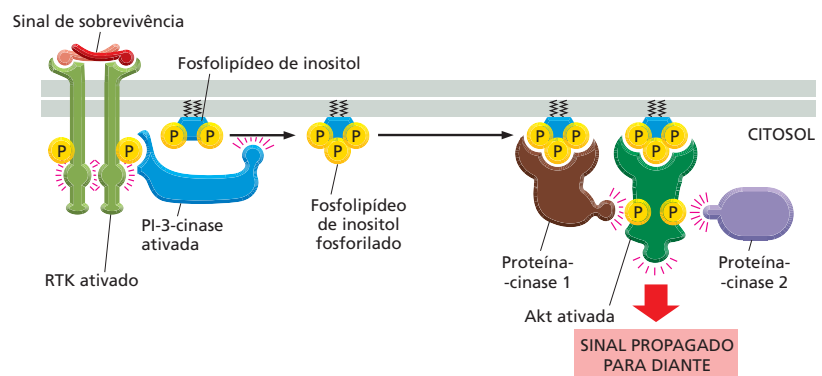
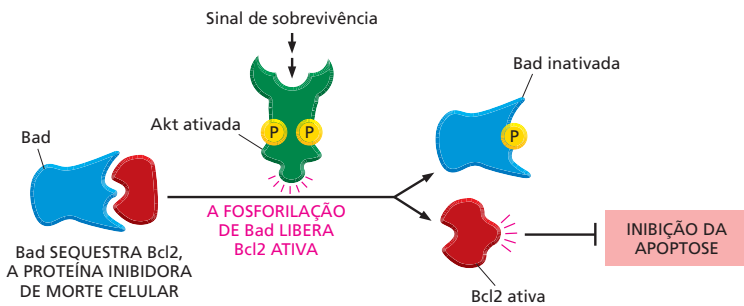



Figura 16-34 **Akt ativada promove a sobrevivência celular.** Ela o faz por meio da fosforilação e da ativação da proteína denominada Bad. Esta, no seu estado não fosforilado, promove apoptose (uma forma de morte celular) por se ligar e inibir uma proteína, a Bcl2, a qual impede a apoptose. Ao ser fosforilada pela Akt, a Bad libera Bcl2, que agora bloqueia a apoptose, promovendo, assim, a sobrevivência celular.

Akt fosforila e inativa uma proteína citosólica denominada *Bad.* No seu estado ativo, Bad encoraja a célula a se matar por ativar indiretamente um programa de suicídio celular chamado de apoptose (discutido no Capítulo 18). Dessa forma, a fosforilação por Akt promove a sobrevivência pela inativação de uma proteína que promove a morte celular (**Figura 16-34**).

A *via de sinalização PI3-cinase-Akt*, além de promover a sobrevivência, também estimula as células a crescer em tamanho. Isso é feito pela ativação indireta de uma serina/treonina-cinase denominada *Tor*. Essa enzima estimula o crescimento das células pelo aumento da síntese proteica e pela inibição da degradação (**Figura 16-35**). O fármaco anticâncer rapamicina atua na inativação de Tor, reforçando a importância da via de sinalização PI-3-cinase-Akt na regulação da sobrevivência e no crescimento celular.

Alguns receptores associados a enzimas ativam um caminho rápido para o núcleo

Nem todos os receptores associados a enzimas desencadeiam cascatas de sinalização complexas que exigem a cooperação de uma sequência de proteína-cinases para levar uma mensagem para o núcleo. Alguns receptores utilizam uma rota mais direta para controlar a expressão gênica.

Alguns hormônios e muitos mediadores locais chamados de **citocinas** se ligam a receptores que podem ativar reguladores de transcrição que são mantidos em estado latente próximos à membrana plasmática. Essas proteínas reguladoras – chamadas de STATs (de *signal transducers and activators of transcription*, ou transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição) –, ao serem ativadas, seguem direto para o núcleo, onde estimulam a transcrição de genes específicos. Essa via de sinalização direta é utilizada, por exemplo, pelos *interferons,* os quais são citocinas produzidas por células infectadas, com a função de instruir outras células na produção de proteínas que irão torná-las mais resistentes à infecção viral.

Ao contrário dos receptores tirosina-cinase que estimulam cascatas de sinalização elaboradas, os receptores de citocinas e de hormônios que interagem com as STATs não apresentam atividade enzimática intrínseca. Eles estão associados a tirosina-cinases citoplasmáticas denominadas *JAKs,* que são ativadas quando uma citocina ou um hormônio se liga ao seu receptor. As JAKs, ao serem ativadas, fosforilam e ativam as STATs, as quais migram para o núcleo, onde estimulam a transcrição de genes-alvo específicos. O hormônio prolactina, por exemplo, que estimula as células da mama a produzir leite, atua por ligar-se

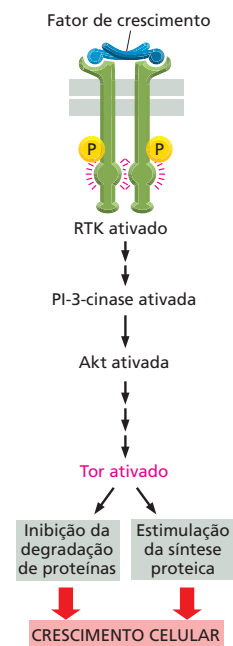



Figura 16-35 **Akt estimula o crescimento celular em tamanho pela ativação de Tor.** A ligação de um fator de crescimento a um receptor tirosina-cinase ativa a via de sinalização PI-3-cinase-Akt (como é mostrado na Figura 16-33). Akt então estimula indiretamente a Tor (pela fosforilação e consequente inibição de uma proteína que ajuda a manter Tor inativa; não mostrado). A Tor é, ela própria, uma serino/treonina-cinase e estimula a síntese proteica e inibe a degradação de proteínas (pela fosforilação de proteínas-chave nesses processos; não mostrado). O fármaco anticâncer rapamicina reduz o crescimento e a proliferação celular porque inibe Tor. A proteína Tor tem seu nome derivado do fato de ser um alvo da rapamicina.

COMO SABEMOS:
A ELUCIDAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR

As vias de sinalização intracelular não foram mapeadas em um único experimento. Os investigadores imaginaram, peça por peça, como se adaptam todos os contatos ao longo da cadeia – e como cada um deles contribui para a resposta celular a um sinal extracelular, como, por exemplo, o hormônio insulina. O processo envolve reduzir as questões amplas de como a célula responde a um sinal a questões menores e mais controláveis: qual proteína é receptora da insulina? Quais proteínas intracelulares são ativadas quando a insulina está presente? Com quais proteínas as ativadas interagem? Como uma proteína ativa outra? Discutiremos agora os tipos de experimentos que forneceram respostas para tais enigmas.

Fosforilação estimulada

Quando as células são expostas a uma molécula-sinal extracelular, o resultado é que algumas proteínas se tornam fosforiladas. Algumas delas serão as sinalizadoras intracelulares responsáveis pela propagação da mensagem por toda a célula; outras serão as proteínas efetoras responsáveis pela resposta celular. Para determinar quais eram as moléculas ativadas pela fosforilação, os pesquisadores romperam as células, separaram as proteínas, por tamanho, em um gel (discutido no Capítulo 4, Painéis 4-4 a 4-6, p. 164-167), e usaram anticorpos para detectar as proteínas fosforiladas.

Outra maneira usual de visualizar proteínas recentemente fosforiladas envolve suprir as células com uma versão radioativa de ATP quando estiverem expostas a uma molécula-sinal extracelular. As proteína-cinases ativadas pelo sinal transferirão fosfato radioativo do ATP marcado para seus substratos. Novamente as proteínas são separadas em um gel, mas, nesse caso, as proteínas radioativas são detectadas pela exposição do gel a um filme de raios X.

Encontros íntimos

Logo que as proteínas forem identificadas, podem ser determinadas quais proteínas interagem com elas. Para identificar proteínas que interagem, os cientistas fazem uso, com frequência, da *coimunoprecipitação.* Nessa técnica, são usados anticorpos para "agarrar-se" a uma proteína específica, removendo-a da solução e precipitando-a no fundo do tubo de ensaio (discutido no Capítulo 4, Painel 4-3, p. 144-145). Se a proteína capturada estiver ligada a outras, essas serão precipitadas também. Dessa forma, os pesquisadores podem identificar quais proteínas interagem quando a célula é estimulada por uma molécula-sinal extracelular.

Sabendo-se que duas proteínas interagem, o pesquisador pode procurar identificar quais as partes das proteínas necessárias para a interação. Isso frequentemente envolve o uso da tecnologia do DNA recombinante para construir um conjunto de proteínas mutantes, cada uma delas diferindo ligeiramente da normal. Por exemplo, para determinar a qual tirosina fosforilada de um receptor tirosina-cinase uma determinada proteína sinalizadora intracelular se liga, é usada uma série de mutantes, cada um deles sem uma das tirosinas do seu domínio citoplasmático (**Figura 16-36**). Dessa forma, podem ser determinadas as tirosinas específicas necessárias para a ligação. Pode-se determinar, similarmente, se esse sítio de ancoragem é necessário para a transmissão do sinal do receptor para a célula.

Obstrução da via

No final, deseja-se avaliar a importância de uma determinada proteína para um processo de sinalização. O primeiro passo envolve o uso da tecnologia do DNA recombinante para introduzir na célula um gene que codifica uma forma permanentemente ativa da proteína, para verificar se isso mimetiza o efeito do sinal extracelular. Vejamos, por exemplo, Ras. A forma de Ras envolvida com cânceres humanos está permanentemente ativa porque perdeu a capacidade de hidrolisar o GTP que a mantém ativa. Essa forma pode estimular a proliferação de algumas células mesmo na ausência de mitógenos, produzindo, dessa forma, o desenvolvimento do câncer (**Figura 16-37**).

O teste conclusivo da importância de uma proteína intracelular para uma via de sinalização consiste em inativar a proteína ou o seu gene e verificar se a via é afetada. No caso de Ras, por exemplo, pode-se introduzir nas células uma forma mutante "dominante negativa". Essa forma de Ras inoperante se prende tão fortemente ao GDP que não pode ser ativada. Dado que ainda assim ela pode ligar-se a outros componentes sinalizadores, ela obstrui a via, impedindo a atuação de cópias normais de Ras. Essas células paralisadas não respondem a sinais extracelulares estimulantes de proliferação, indicando a importância da sinalização de Ras normal na resposta proliferativa.

Organização da via

A maioria das vias de sinalização leva décadas para ser desvendada. Apesar de a insulina ter sido isolada pela primeira vez em 1920, a partir do pâncreas de cão, ainda não está totalmente esclarecida a cadeia de eventos que conecta a interação do hormônio ao seu receptor com a ativação das proteínas transportadoras que captam glicose.

Uma estratégia poderosa usada pelos cientistas para identificar proteínas que participam na sinalização celular envolve a triagem de um número enorme de animais – geralmente dezenas de milhares de moscas-das-frutas ou vermes nematódeos tratados previamente com um agente mutagênico. Eles procuram mutantes nos quais uma das vias de sinalização não esteja funcionando adequadamente. As moscas e os vermes são úteis porque se reproduzem rapidamente e podem ser mantidos em grande número no laboratório. Como resultados do exame de um número suficientemente grande de mutantes, foram identificados muitos dos genes que codificam proteínas envolvidas em cascatas de sinalização – incluindo

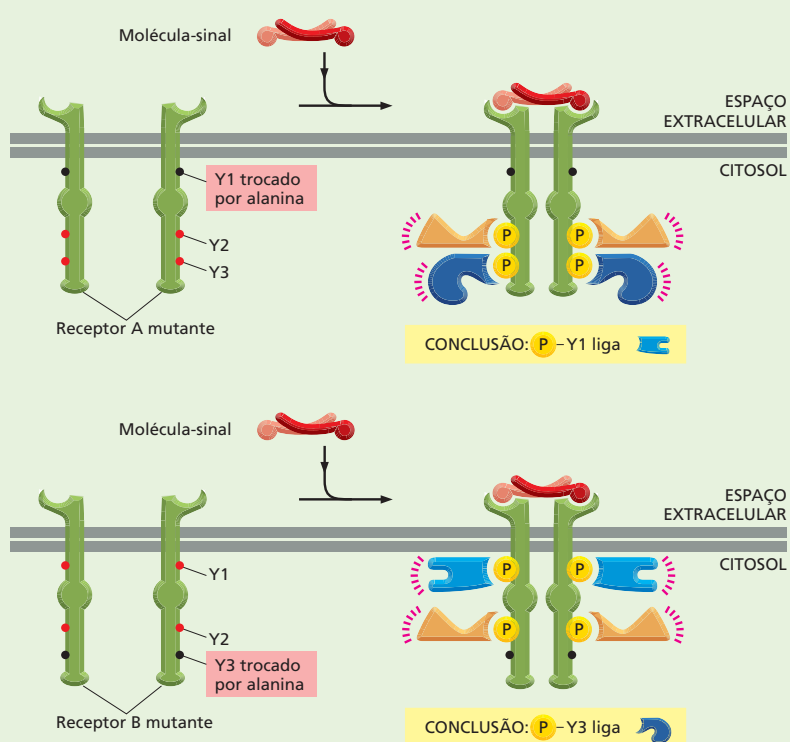



Figura 16-36 Proteínas mutantes podem ajudar a determinar o local exato de ligação de uma molécula sinalizadora intracelular. Conforme mostrado na Figura 16-30, a ligação da molécula-sinal extracelular provoca a aproximação de dois receptores tirosina-cinase seguida da fosforilação recíproca de tirosinas específicas das suas caudas citoplasmáticas. Essas tirosinas atraem diferentes moléculas sinalizadoras intracelulares que se ativam e passam adiante o sinal. Uma série de receptores mutantes foi construída para determinar qual tirosina se liga a uma molécula sinalizadora específica. Nos mutantes mostrados, as tirosinas (Y1 ou Y3) foram substituídas por alaninas. Como resultado, os receptores mutantes não mais se ligaram às proteínas sinalizadoras intracelulares mostradas na Figura 16-30. O efeito do sinal sobre a resposta celular pode então ser determinado. É importante que o receptor mutante seja testado em células que não possuam seus próprios receptores normais para a molécula-sinal.

receptores, proteína-cinases, reguladores de transcrição, e assim por diante.

Essas triagens genéticas também revelam a ordem de atuação das proteínas sinalizadoras intracelulares em uma determinada via. Suponha que a triagem genética identifique duas proteínas X e Y na via de sinalização da Ras (**Figura 16-38A**). Suponha que a triagem genética identifique duas novas proteínas, X e Y, na via de sinalização da Ras. Como hipótese, imagine que o receptor ative a proteína X, que então ativa Ras, que ativa a proteína Y (Figura 16-38A). Para testar essa hipótese, poderia introduzir-se uma forma mutante inativa da proteína X ou da Y na célula e então investigar se o mutante pode ser "resgatado" pela adição de uma forma permanentemente ativa de Ras. Se a versão permanentemente ativa de Ras superar o bloqueio criado pela proteína mutante, então Ras deve atuar depois daquela proteína na via (Figura 16-38B). Se Ras atuar antes da proteína na via, uma Ras ativada permanentemente será incapaz de transmitir um sinal para além da obstrução causada pela proteína defectiva (Figura 16-38C).

Essas técnicas bioquímicas e genéticas permitem, quando usadas em conjunto, a elucidação das mais complexas vias de sinalização intracelular.

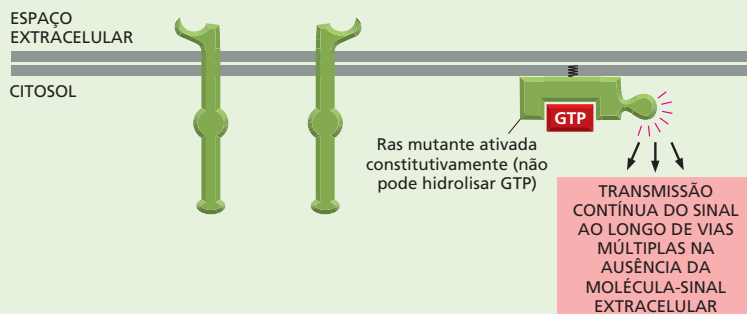



Figura 16-37 Uma forma constitutivamente ativa de Ras transmite o sinal, mesmo na ausência de uma molécula-sinal extracelular. Como está mostrado na Figura 16-31, a proteína Ras normal é ativada em resposta a determinados sinais extracelulares. A forma hiperativa de Ras mostrada aqui perdeu a capacidade de hidrolisar GTP. Assim, ela não pode desligar sua atividade e, como resultado, está permanentemente (constitutivamente) ativa.

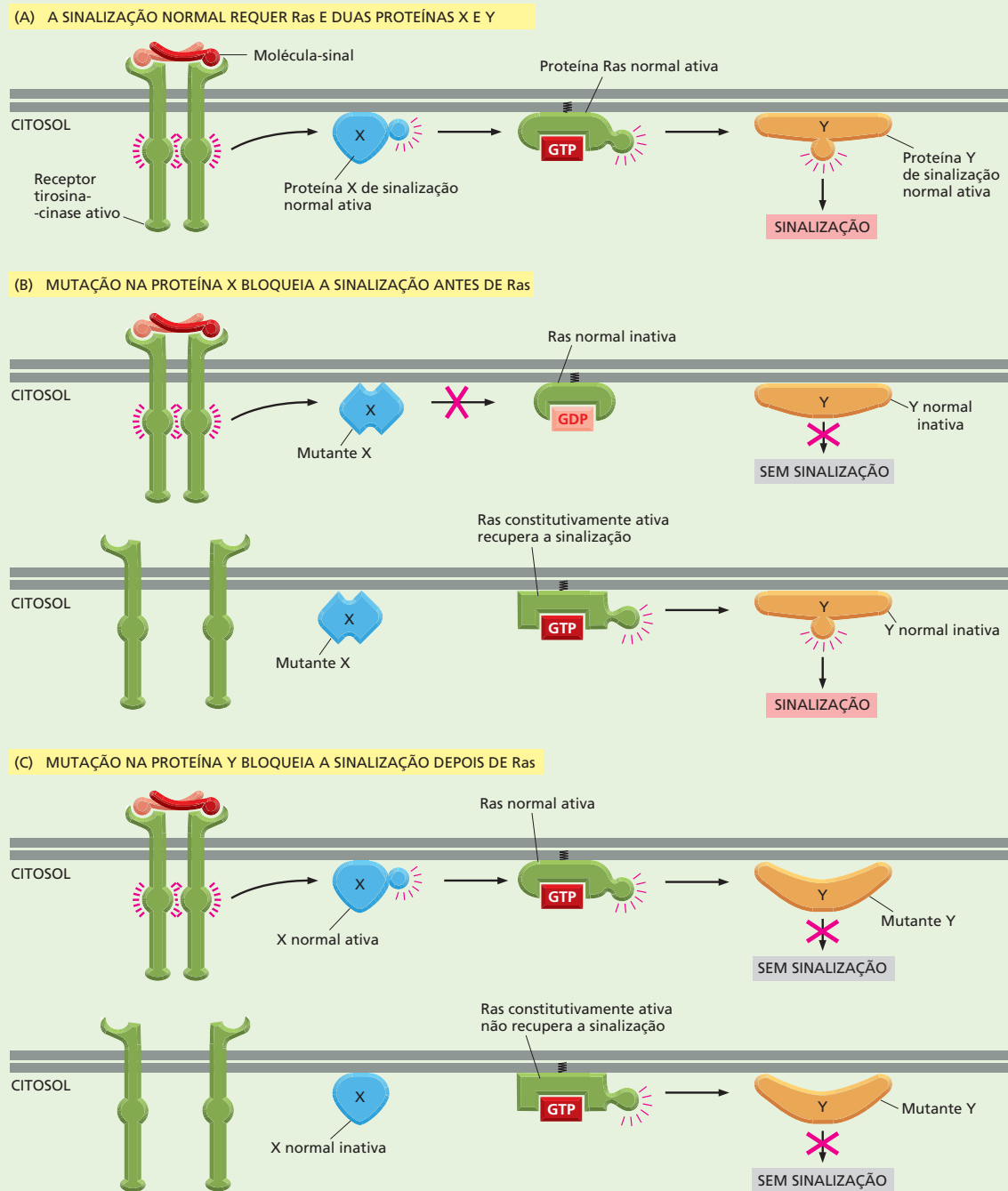



Figura 16-38 A análise genética revela a ordem de atuação das proteínas sinalizadoras intracelulares em uma via. Uma via de sinalização pode ser inativada por mutações em qualquer um de seus componentes. Mostramos, aqui, como uma via de sinalização hipotética de Ras (A) pode ser desligada por uma mutação na proteína X (B) ou na proteína Y (C). A adição de uma forma constitutivamente ativa de Ras a essas células pode ajudar a elucidar a posição da proteína mutante na via. A adição de uma forma ativa de Ras às células com mutação em X restaura a atividade da via, permitindo que o sinal seja transmitido mesmo na ausência de uma molécula-sinal extracelular (B). Uma Ras demasiadamente ativa pode recuperar essas células porque a Ras se situa adiante da proteína mutante X que está obstruindo a via. A adição de uma forma ativa de Ras às células com a mutação na proteína Y não as recupera, já que a Ras está situada antes do bloqueio (C).

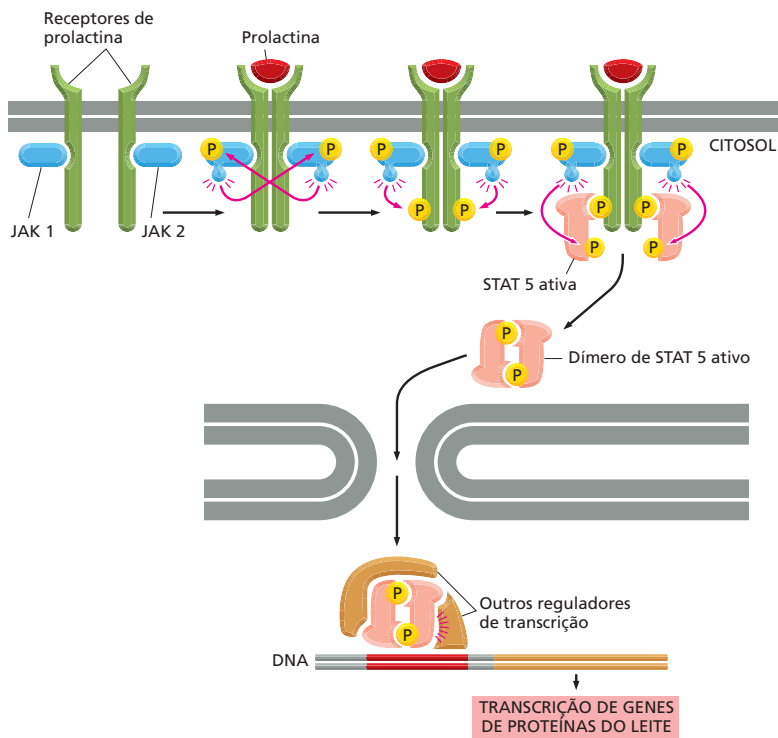



Figura 16-39 O hormônio prolactina estimula a produção de leite pela ativação da via de sinalização JAK-STAT. A ligação da prolactina ao seu receptor associado a enzimas faz com que as tirosina-cinases associadas (nesse caso, JAK1 e JAK2) se fosforilem reciprocamente e se ativem. Essas então fosforilam as tirosinas das proteínas receptoras. Os reguladores transcricionais denominados STATs (de *signal transducers and activators of transcription*, ou transdutores de sinal e ativadores de transcrição) (nesse caso, STAT5), presentes no citosol se ligam às fosfotirosinas do receptor e são também fosforiladas e ativadas pelas JAKs. As STATs ativadas então se dissociam das proteínas receptoras, dimerizam e migram para o núcleo. Lá, com a ajuda de outros reguladores transcricionais, ativam a transcrição de genes que codificam as proteínas do leite.

a um receptor que está associado a um par específico de JAKs. Essas ativam uma STAT específica que aciona os genes que codificam as proteínas do leite (**Figura 16-39**).

Diferentes receptores de citocinas e de hormônios evocam respostas celulares diferentes porque ativam diferentes STATs. Como qualquer outra via ativada por fosforilação, o sinal das citocinas é extinto por fosfatases que removem os grupos fosfato das proteínas sinalizadoras ativadas.

Uma via de sinalização ainda mais direta é utilizada pela proteína receptora Notch, que controla, entre outras coisas, o desenvolvimento das células neurais em *Drosophila* (ver Figura 16-4). Nessa via, o próprio receptor age como um regulador de transcrição. Esse receptor é clivado quando ativado pela ligação com a proteína Delta, a qual está fixada a uma célula vizinha. Essa clivagem libera a cauda citosólica do receptor, que se dirige para o núcleo onde auxilia na ativação do grupo adequado de genes de resposta a Notch (**Figura 16-40**). Essa via de sina-

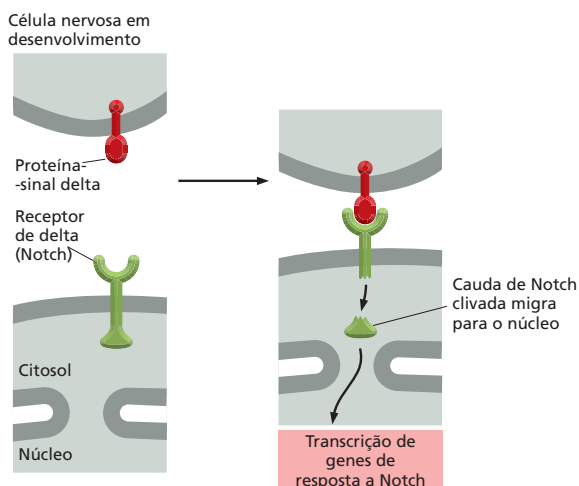



Figura 16-40 O receptor de Notch é, ele próprio, um regulador transcricional. A ligação da proteína-sinal Delta, ligada à membrana, ao seu receptor Notch em uma célula vizinha, causa a clivagem do receptor. A parte da cauda citosólica liberada vai para o núcleo, onde ativa os genes de resposta a Notch. A Figura 16-4 mostra uma consequência desse processo de sinalização.

lização utiliza a via mais simples e mais direta de transmissão de um sinal de um receptor de superfície celular para o núcleo.

A multicelularidade e a comunicação celular evoluíram independentemente em plantas e animais

As plantas e os animais evoluíram independentemente por mais de um bilhão de anos, sendo que o último ancestral comum foi um eucarioto unicelular que provavelmente vivia por conta própria. Desde que esses reinos divergiram há tanto tempo – quando ainda era "cada célula por si mesma" –, cada um desenvolveu soluções moleculares próprias para se tornarem multicelulares. Assim, os mecanismos de comunicação célula-célula nas plantas e nos animais evoluíram separadamente, e se esperava que fossem completamente diferentes. Ao mesmo tempo, contudo, as plantas e os animais iniciaram com um conjunto comum de genes eucarióticos – incluindo alguns utilizados pelos organismos unicelulares para se comunicar entre si –, e, dessa forma, seus sistemas de sinalização deveriam apresentar algumas semelhanças.

As plantas, como os animais, utilizam extensivamente receptores de superfície inseridos na membrana – especialmente receptores associados a enzimas. A planta *Arabidopsis thaliana* (ver Figura 1-33) possui centenas de genes que codificam receptores serina/treonina-cinase. Esses, no entanto, são estruturalmente diferentes dos encontrados nas células animais (que não serão discutidos neste capítulo). Acredita-se que tais receptores desempenhem papel importante em uma variedade de processos de sinalização nas plantas, incluindo aqueles que governam o crescimento, o desenvolvimento e a resistência a doenças. Ao contrário das células animais, as células vegetais aparentemente não usam receptores tirosina-cinase, nem receptores nucleares para hormônios esteroides, ou AMP cíclico, e aparentemente utilizam poucos receptores associados à proteína G.

Um dos sistemas de sinalização mais bem estudado em plantas medeia a resposta das células ao etileno – um hormônio gasoso que regula um conjunto diversificado de processos de desenvolvimento, incluindo a germinação das sementes e o amadurecimento dos frutos. Os produtores de tomate utilizam o etileno para amadurecer os frutos depois de terem sido colhidos. Os receptores para o etileno não pertencem a nenhuma das classes de proteínas receptoras que estudamos até agora. Eles são proteínas transmembrana diméricas, e, surpreendentemente, o receptor é ativo quando está vazio. Na ausência do etileno, o receptor vazio ativa uma proteína-cinase que basicamente desliga os genes de resposta ao etileno no núcleo. Na presença do etileno, o receptor e a cinase estão inativos, e os genes de resposta ao etileno são transcritos (**Figura 16-41**). Essa estratégia, pela qual os sinais atuam liberando uma inibição transcricional, é muito utilizada pelas plantas.

As redes de proteína-cinases integram a informação para controlar comportamentos celulares complexos

Neste capítulo, descrevemos várias vias para a transmissão de um sinal da superfície da célula para o seu interior. A **Figura 16-42** compara cinco dessas vias: aquelas desde os GPCRs via adenilato-ciclase e via fosfolipase C, e aquelas desde os receptores tirosina-cinases via fosfolipase C, via Ras e via PI-3-cinase. As vias são diferentes umas das outras, apesar de usarem componentes comuns para transmitir seus sinais. Uma vez que todas elas no final ativam proteína-cinases, a impressão é que cada uma delas é capaz de, em princípio, regular praticamente qualquer processo na célula.

A complexidade da sinalização celular é muito maior do que descrevemos. Antes de tudo, não discutimos muitas das vias de sinalização intracelulares disponíveis para as células, ainda que muitas delas sejam fundamentais para o desenvolvimento correto e estejam perturbadas nas células cancerosas (ver Figura 20-49).

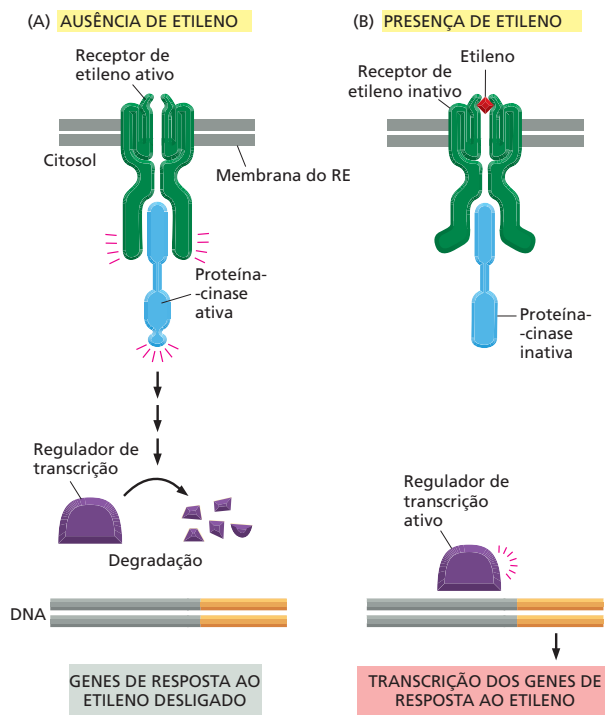



Figura 16-41 A via de sinalização do etileno ativa os genes pela remoção da inibição. (A) Na ausência do etileno, o receptor ativa diretamente uma proteína-cinase, a qual promove a destruição do regulador de transcrição que ativa os genes de resposta ao etileno. Como consequência, os genes permanecem desativados. (B) Na presença do etileno, o receptor e a cinase estão inativos, e o regulador de transcrição permanece intacto, podendo estimular a transcrição dos genes de resposta ao etileno. A cinase que interage com os receptores do etileno é uma serina/treonina-cinase muito semelhante à MAP-cinase-cinase-cinase encontrada nas células animais (ver Figura 16-32).

O mais importante, talvez, é que as principais vias de sinalização que foram apresentadas interagem por vias que não foram descritas. Elas estão conectadas por muitos tipos de interações, mas as ligações mais extensas são aquelas mediadas pelas proteína-cinases presentes em todas as vias. Essas cinases fosforilam, e assim regulam, componentes de outras vias de sinalização além dos componentes da via à qual elas pertencem. Assim, ocorre um determinado

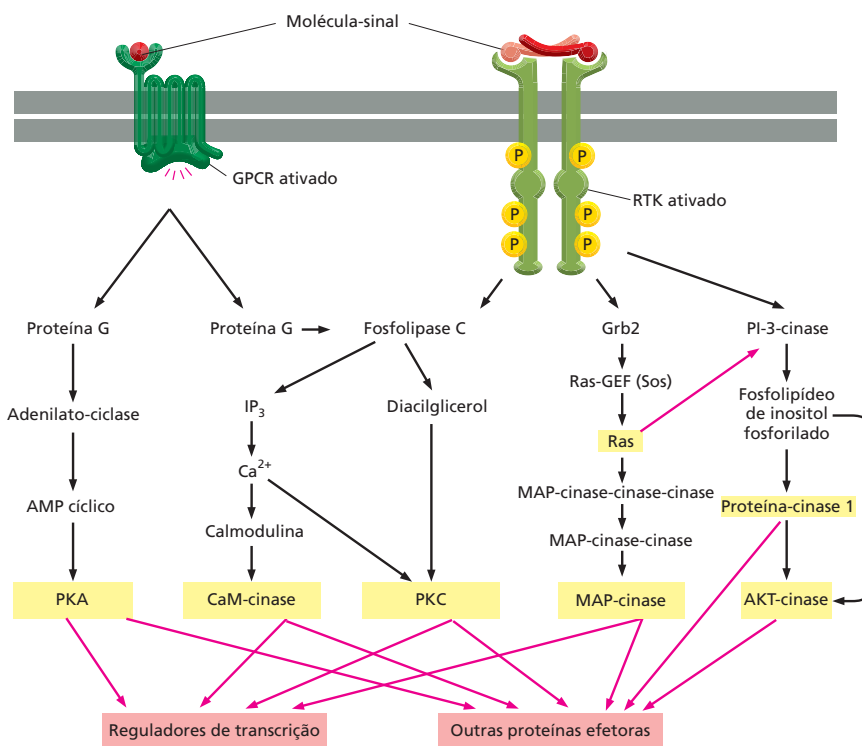



Figura 16-42 As vias de sinalização estão altamente interconectadas. O diagrama esboça duas vias a partir dos receptores associados à proteína G – via adenilato-ciclase e via fosfolipase C –, e três dos receptores tirosina-cinase – via fosfolipase C, via Ras e via PI-3-cinase. Nessas vias, as proteína-cinases fosforilam muitas proteínas, inclusive proteínas que pertencem a outras vias. A densa rede de interconexões reguladoras resultante é simbolizada pelas setas *vermelhas* que irradiam de cada cinase sombreada em *amarelo*. Algumas cinases fosforilam as mesmas proteínas efetoras. Pequenos mensageiros intracelulares, como o Ca^{2+}, também podem influenciar a atividade de múltiplas vias.

entrecruzamento entre as diferentes vias (ver Figura 16-42) e, na verdade, entre praticamente todos os sistemas de controle da célula. Para dar uma ideia do grau de complexidade, os estudos de sequenciamento genômico sugerem que 2% de nossos ~20.000 genes codificadores de proteínas codificam proteína-cinases; além disso, acredita-se que centenas de tipos diferentes de proteína-cinases estejam presentes em uma única célula de mamífero. Como podemos dar sentido a essa rede entrelaçada de vias de sinalização interatuantes, e qual é a função dessa complexidade?

Uma célula recebe mensagens de muitas fontes, e ela deve integrar as informações para gerar uma resposta adequada: viver ou morrer, dividir-se ou diferenciar-se, alterar a forma, locomover-se, enviar, ela própria, uma mensagem química, e assim por diante (**Animações 16.7**, **16.8** e **16.9**). Por meio da interação entre vias de sinalização, a célula é capaz de reunir múltiplas partículas de informação e reagir à sua combinação. Assim, algumas proteínas sinalizadoras intracelulares atuam como dispositivos de integração, geralmente por possuírem vários sítios potenciais para fosforilação, e cada um deles pode ser fosforilado por uma proteína-cinase diferente. A informação recebida de diferentes fontes converge em tais proteínas, as quais então convertem os sinais de entrada em um único sinal de saída (**Figura 16-43**, e ver Figura 16-13). As proteínas integradoras, por sua vez, distribuem um sinal para muitos alvos subsequentes. Dessa forma, o sistema de sinalização intracelular pode atuar como a rede de células nervosas no cérebro – ou como uma coleção de microprocessadores em um computador –, interpretando informações complexas e gerando respostas complexas.

Nossa exploração das vias usadas pelas células no processamento de sinais do seu meio ambiente nos conduz desde os receptores na superfície celular para as proteínas que formam os sistemas elaborados de controle que atuam no interior da célula. Examinamos um grande conjunto de redes de sinalização que permite às células combinar e processar sinais de entrada de diferentes fontes, armazenar informações e responder de uma maneira adequada que beneficie o organismo. Nosso conhecimento sobre essas redes intrincadas ainda está evoluindo: ainda estamos descobrindo novas ligações nas cadeias, novos parceiros de sinalização, novas conexões, e mesmo novas vias.

O esclarecimento dessas vias de sinalização celular – nos animais e nas plantas – é uma das mais ativas áreas de pesquisa, e todos os dias se fazem novas descobertas. Os projetos de sequenciamento genômico continuam a fornecer longas listas de componentes envolvidos na transdução de sinal em uma grande variedade de organismos. Contudo, mesmo quando tivermos identificado todas as peças, ainda permanecerá o grande desafio de imaginar como essas se combinam para permitir que as células integrem os diversos conjuntos de sinais do seu

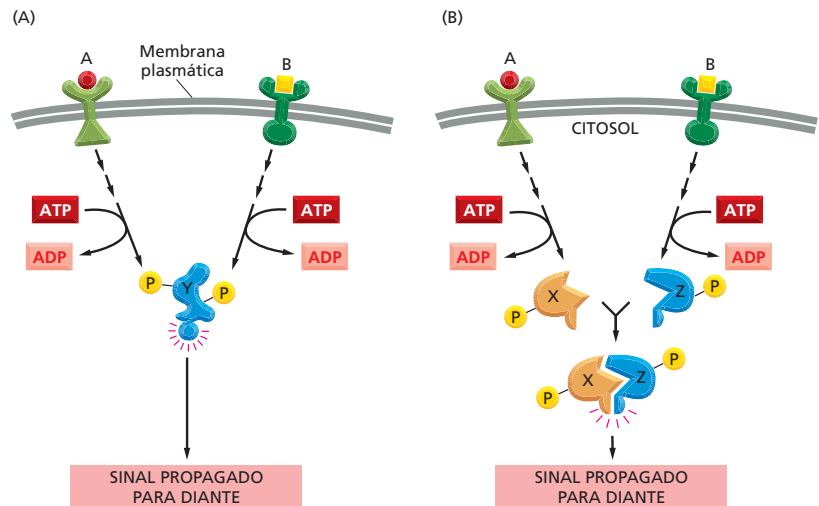



Figura 16-43 Algumas proteínas de sinalização intracelular servem para integrar sinais que chegam. (A) Os sinais A e B podem ativar diferentes cascatas de fosforilação de proteínas, cada um dos quais leva à fosforilação da proteína Y, mas em diferentes sítios. A proteína Y é ativada somente quando ambos os sítios estiverem fosforilados, sendo, portanto, ativa somente quando os sinais A e B estiverem presentes de forma simultânea. (B) Alternativamente, os sinais A e B podem levar à fosforilação de duas proteínas, X e Z, as quais então se ligam uma à outra para criar a proteína XZ ativa.

ambiente e respondam de uma maneira adequada. Ou seja, saber como as células "pensam" é um problema que se assemelha a aprender como nós, os humanos, pensamos. Apesar de sabermos, por exemplo, como os neurotransmissores ativam determinados neurônios, e como um neurônio se comunica com outro, estamos muito longe de termos uma compreensão fundamental de como todos esses componentes atuam juntos para nos permitir pensar, conversar, rir, amar e tentar elucidar a natureza fundamental do universo e da vida na Terra.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- **As células dos organismos multicelulares se comunicam por meio de uma variedade de sinais químicos extracelulares.**
- **Nos animais, os hormônios são levados pelo sangue para células-alvo distantes, mas a maioria das outras moléculas-sinal extracelulares atua somente a uma curta distância. As células vizinhas frequentemente se comunicam por meio de contatos diretos célula-célula.**
- **As células são estimuladas por moléculas-sinal extracelulares quando estas se ligam a proteínas receptoras e as ativam. Cada receptor reconhece uma molécula-sinal específica.**
- **Pequenas moléculas-sinal extracelulares hidrofóbicas, como os hormônios esteroides ou o óxido nítrico, difundem-se pela membrana plasmática; eles ativam proteínas intracelulares, que são em geral reguladores de transcrição ou enzimas.**
- **A maioria das moléculas-sinal extracelulares não atravessa a membrana plasmática. Elas se ligam a proteínas receptoras na superfície celular que convertem (transduzem) o sinal extracelular em diferentes sinais intracelulares.**
- **Existem três classes principais de receptores de superfície celular: (1) associados a canais iônicos, (2) associados à proteína G (GPCRs) e (3) associados a enzimas.**
- **Os receptores associados à proteína G e os receptores associados a enzimas respondem aos sinais extracelulares desencadeando cascatas de reações de sinalização intracelular que alteram o comportamento da célula.**
- **Desativar as vias de sinalização é tão importante quanto ativá-las. Os componentes que foram ativados em uma via devem ser subsequentemente inativados ou removidos para que essa funcione novamente.**
- **Os receptores associados à proteína G ativam uma classe de proteínas triméricas de ligação de GTP chamadas proteínas G. Elas funcionam como interruptores moleculares, transmitindo o sinal à frente por um período curto seguido da hidrólise do seu GTP a GDP, o que leva à inativação da proteína.**
- **Algumas proteínas G regulam canais iônicos na membrana plasmática. Outras ativam (ou inativam) a enzima adenilato-ciclase, o que causa um aumento (ou uma redução) na concentração intracelular do pequeno mensageiro AMP cíclico. Outras proteínas G ativam a enzima fosfolipase C, a qual gera as pequenas moléculas mensageiras trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol.**
- **O IP_3 abre os canais de Ca^{2+} da membrana do retículo endoplasmático, liberando um fluxo de íons Ca^{2+} livres no citosol. O próprio Ca^{2+} atua como um pequeno mensageiro intracelular, alterando a atividade de uma ampla série de proteínas, incluindo a calmodulina, que ativam várias proteínas-alvo, como as proteína-cinases dependentes de Ca^{2+}/calmodulina (CaM-cinases).**
- **Um aumento do AMP cíclico ativa a proteína-cinase A (PKA), e o Ca^{2+} e o diacilglicerol, em conjunto, ativam a proteína-cinase C (PKC).**

- PKA, PKC e CaM-cinases fosforilam as serinas e as treoninas de proteínas-alvo selecionadas, o que altera a atividade dessas proteínas. Diferentes tipos celulares contêm diferentes conjuntos de proteínas-alvo e são afetados de diferentes maneiras.
- Muitos receptores associados a enzimas possuem domínios proteicos intracelulares que têm função enzimática. Muitos são receptores tirosina-cinase que fosforilam suas próprias tirosinas e as de proteínas intracelulares selecionadas.
- As fosfotirosinas dos receptores tirosina-cinase servem como sítios de ancoragem para várias proteínas sinalizadoras intracelulares, geralmente incluindo Ras, uma pequena proteína de ligação a GTP. Essa ativa um módulo de sinalização de três MAP-cinases que auxilia na transmissão do sinal desde a membrana plasmática até o núcleo.
- As mutações que estimulam a proliferação celular, porque tornam a Ras permanentemente ativa, são uma característica comum a muitos cânceres humanos.
- Alguns receptores associados a enzimas estimulam o crescimento celular e a sobrevivência, pois ativam a PI-3-cinase, que fosforila fosfolipídeos de inositol específicos para produzir sítios lipídicos de ancoragem na membrana plasmática que permitem a reunião e ativação mútua de proteínas sinalizadoras específicas.
- Alguns receptores, incluindo Notch e receptores de citocinas, ativam uma via direta ao núcleo. Em vez de ativarem cascatas de sinalização, eles ativam reguladores de transcrição na membrana plasmática, os quais migram para o núcleo, onde ativam genes específicos.
- As plantas, como os animais, usam receptores associados a enzimas na superfície celular para controlar seu crescimento e seu desenvolvimento.
- Sinais extracelulares em plantas atuam, com frequência, aliviando a repressão da transcrição de genes de resposta aos sinais.
- Diferentes vias de sinalização intracelulares interagem, o que permite às células produzir uma resposta adequada a uma combinação complexa de sinais. Algumas combinações permitem que as células sobrevivam, ao passo que outras causarão sua proliferação. Na ausência de sinais, a maioria das células se suicida por apoptose.

TERMOS-CHAVE

adaptação
adenilato-ciclase
proteína-cinase dependente de Ca^{2+}/calmodulina (CaM-cinase)
sinalização celular
citocina
AMP cíclico
calmodulina
módulo de sinalização da MAP-cinase
diacilglicerol (DAG)
fosfolipase C
fosfolipídeo de inositol
fosfoinositídeo-3-cinase (PI-3-cinase)
GTPase monomérica
hormônio
hormônio esteroide
inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3)
interruptor molecular
MAP-cinase
mediador local
molécula-sinal extracelular
molécula sinalizadora intracelular
neurotransmissor
óxido nítrico (NO)
proteína G
proteína de ligação a GTP
proteína-cinase
proteína-fosfatase
receptor associado a canais iônicos
receptor, proteína receptora
proteína-cinase dependente de AMP cíclico (PKA)
proteína-cinase C (PKC)
Ras
receptor associado a enzimas
receptor tirosina-cinase (RTK)
receptor associado à proteína G (GPCR)
receptor de citocina
receptor nuclear
receptor serina/treonina-cinase
via de sinalização intracelular
segundo mensageiro
serina/treonina-cinase
transdução de sinal
pequeno mensageiro
tirosina-cinase

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 16-10

Uma vez que os receptores de superfície celular, incluindo os receptores de citocinas e Notch, podem sinalizar rapidamente para o núcleo pela ativação de reguladores de transcrição na membrana plasmática, por que a maioria desses receptores usa cascatas de sinalização longas e indiretas para influenciar a transcrição gênica no núcleo?

QUESTÃO 16-11

Quais das seguintes afirmativas estão corretas? Explique suas respostas.

A. A molécula-sinal extracelular acetilcolina tem efeitos diferentes em diferentes tipos celulares de um animal e se liga a diferentes moléculas receptoras nessas células.

B. Depois de ser secretada, a acetilcolina tem uma vida longa, pois tem de alcançar células-alvo em todo o corpo.

C. As subunidades α ligadas a GTP e os complexos $\beta\gamma$ sem o nucleotídeo – mas não a proteína G totalmente montada e ligada a GDP – ativam outras moléculas posicionadas após os receptores associados à proteína G.

D. IP_3 é produzido pela hidrólise de um fosfolipídeo de inositol sem a incorporação de um grupo fosfato adicional.

E. A calmodulina regula a concentração intracelular de Ca^{2+}.

F. Diferentes sinais com origem na membrana plasmática podem ser integrados pela intercomunicação recíproca entre vias de sinalização diferentes dentro da célula.

G. A fosforilação de tirosinas serve para gerar sítios de ligação para que outras proteínas se liguem aos receptores tirosina-cinase.

QUESTÃO 16-12

A proteína Ras funciona como um interruptor molecular que é “ligado” por outras proteínas que a induzem abandonar seu GDP e se ligar a GTP. Uma proteína ativadora de GTPase a conduz ao seu estado “desligado” pela indução da hidrólise do GTP a GDP pela Ras muito mais rapidamente do que sem essa proteína. Assim, a Ras funciona como se fosse um interruptor de uma lâmpada que é ligada por uma pessoa e desligada por outra. Você tem uma célula mutante que não possui a atividade da proteína ativadora de GTPase. Que anormalidades você esperaria encontrar na resposta de Ras a sinais extracelulares?

QUESTÃO 16-13

A. Compare e contraste a sinalização por neurônios, que secretam neurotransmissores nas sinapses, com a sinalização efetuada pelas células endócrinas, que secretam hormônios no sangue.

B. Discuta as vantagens relativas dos dois mecanismos.

QUESTÃO 16-14

Duas moléculas intracelulares, X e Y, são normalmente sintetizadas na célula, a uma taxa constante de 1.000 moléculas por segundo. A molécula X é degradada lentamente: cada uma sobrevive, em média, 100 segundos. A molécula Y é degradada 10 vezes mais rapidamente: cada uma sobrevive, em média, 10 segundos.

A. Calcule quantas moléculas X e Y a célula possui em um dado tempo.

B. Se a taxa de síntese for aumentada, subitamente, para 10.000 moléculas por segundo por célula – sem mudança na sua taxa de degradação –, quantas moléculas X e Y existirão após um segundo?

C. Quais seriam as moléculas preferidas para uma sinalização rápida?

QUESTÃO 16-15

“Um dos grandes reis do passado governava um enorme reino que era mais bonito do que qualquer outro no mundo. Cada planta resplandecia tão brilhantemente como jade polido, e as colinas suavemente onduladas eram tão lisas como as ondas do mar de verão. A sabedoria de todas as suas decisões era resultado de um fluxo de informação constante levado a ele, diariamente, por mensageiros que relatavam cada detalhe do que ocorria no reino, de modo que ele podia agir rápida e adequadamente quando necessário. Apesar da abundância de beleza e eficiência, seu povo se sentia condenado sob seu governo, porque ele tinha um conselheiro que havia estudado transdução de sinal celular e administrava o Departamento de Informação real. O conselheiro implantou a política de que todos os mensageiros deveriam ser decapitados tão logo fossem localizados pela Guarda Real, porque o tempo de vida dos mensageiros deveria ser curto para que a sinalização fosse rápida. Seus apelos ‘Não me machuque, eu sou somente o mensageiro!’ eram vãos, e o povo do reino sofria terrivelmente pela perda rápida de seus filhos e filhas.” Por que a analogia na qual o conselheiro baseou sua política não é adequada? Discuta brevemente as características que regulam as vias de sinalização não considerando a via de comunicação humana descrita na história.

QUESTÃO 16-16

Os genes que codificam para formas mutantes de um receptor tirosina-cinase foram introduzidos na célula por uma série de experimentos. As células também expressam a forma normal do receptor, embora os genes mutantes tenham sido construídos para exibirem concentrações consideravelmente mais altas do receptor do que do gene normal. Quais seriam as consequências da introdução de um gene mutante para o receptor tirosina-cinase (A) sem o seu domínio extracelular, ou (B) sem seu domínio intracelular?

QUESTÃO 16-17

Discuta a seguinte afirmação: “As proteínas de membrana que a atravessam várias vezes são submetidas a uma mudança conformacional pela interação com o ligante que pode ser percebida no outro lado da membrana. Assim, moléculas proteicas individuais podem transmitir um sinal através da membrana. Em contraste, proteínas de membrana unipasso não podem, individualmente, transmitir uma mudança conformacional pela membrana, necessitando de oligomerização”.

QUESTÃO 16-18

Quais são as semelhanças e as diferenças entre as reações que levam à ativação das proteínas G e as que levam à ativação da Ras?

QUESTÃO 16-19

Por que você supõe que a célula use o Ca^{2+} (que é mantido, pela bomba de Ca^{2+}, em uma concentração intracelular de 10^{-7} M) na sinalização intracelular e não outro íon, por exemplo, o Na^{+} (que é mantido, pela bomba de Na^{+}, em uma concentração intracelular de 10^{-3} M)?

QUESTÃO 16-20

Parece anti-intuitivo que uma célula, mesmo tendo um suprimento abundante de nutrientes disponível, cometa suicídio se não for estimulada constantemente por sinais vindos de outras células (ver Figura 16-6). Em sua opinião, quais poderiam ser as vantagens de uma regulação desse tipo?

QUESTÃO 16-21

A contração do sistema actina-miosina nas células musculares é desencadeada por um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+}. As células musculares possuem canais especializados para liberação de Ca^{2+} – chamados de receptores de rianodina em virtude da sua sensibilidade a esse fármaco – nas membranas do retículo sarcoplasmático, uma forma especializada de retículo endoplasmático. A molécula sinalizadora que abre os receptores de rionidina é o próprio Ca^{2+}, ao contrário dos canais de Ca^{2+} controlados por IP_3 do retículo endoplasmático mostrados na Figura 16-25. Discuta as consequências da existência dos canais de rianodina para a contração muscular.

QUESTÃO 16-22

Duas proteína-cinases, K1 e K2, atuam sequencialmente em uma cascata de sinalização intracelular. Se ambas as cinases possuírem uma mutação que as torne permanentemente não funcionais, a célula não responderá quando receber um sinal extracelular. Uma mutação diferente em K1 a torna permanentemente ativada, de forma que as células contendo essa mutação respondem mesmo na ausência de um sinal extracelular. Você caracteriza uma célula dupla-mutante que contém K2 com a mutação inativadora e K1 com a mutação ativadora. Você observa que a resposta acontece mesmo que nenhum sinal seja recebido pelas células. Na via de sinalização normal, K1 ativa K2 ou K2 ativa K1? Explique sua resposta.

QUESTÃO 16-23

A. Siga as etapas de uma via de sinalização longa e indireta a partir do receptor da superfície celular até uma mudança na expressão gênica no núcleo.

B. Compare essa via com duas vias curtas e diretas que vão da superfície celular até o núcleo.

QUESTÃO 16-24

Por que a PI-3-cinase ativa a cinase Akt após a ativação do receptor tirosina-cinase?

QUESTÃO 16-25

As células animais e vegetais possuem mecanismos de sinalização intracelulares muito diferentes, mas também compartilham alguns mecanismos comuns? Por que você imagina que seja assim

CAPÍTULO 17

O Citoesqueleto

FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

MICROTÚBULOS

FILAMENTOS DE ACTINA

CONTRAÇÃO MUSCULAR

A capacidade de as células eucarióticas adotarem diversas formas, organizarem os vários componentes em seu interior, interagirem mecanicamente com o ambiente e realizarem movimentos coordenados é dependente do **citoesqueleto** – uma intrincada rede de filamentos proteicos que se estende através do citoplasma (**Figura 17-1**). Essa arquitetura de filamentos ajuda a sustentar o volumoso citoplasma de uma célula eucariótica, uma função que é especialmente importante em células de animais, que não possuem parede celular. Apesar de alguns componentes do citoesqueleto estarem presentes em bactérias, o citoesqueleto é mais evidente nas grandes e estruturalmente complexas células eucarióticas.

Diferentemente de nosso esqueleto ósseo, no entanto, o citoesqueleto é uma estrutura altamente dinâmica que está continuamente se reorganizando, conforme as células alteram suas formas, dividem-se e respondem ao ambiente. O citoesqueleto não funciona apenas como os "ossos" de uma célula, mas também como seus "músculos", sendo diretamente responsável por movimentos em larga escala, como o deslizamento de células sobre uma superfície, a contração das células musculares e as alterações no formato celular que ocorrem ao longo do desenvolvimento de um embrião. Sem o citoesqueleto, as feridas nunca cicatrizariam, os músculos seriam inúteis, e os espermatozoides jamais encontrariam o óvulo.

A célula eucariótica, como uma fábrica que produz substâncias complexas, possui um interior altamente organizado, no qual máquinas especializadas, apesar de concentradas em áreas distintas, estão conectadas por meio de sistemas de transporte (discutidos no Capítulo 15). O citoesqueleto controla o posicionamento das organelas que desempenham essas funções especializadas e também fornece a maquinaria de transporte que deve conectá-las. O citoesqueleto é também responsável pela segregação dos cromossomos para as células-filhas e pela separação das células na divisão, como discutido no Capítulo 18.

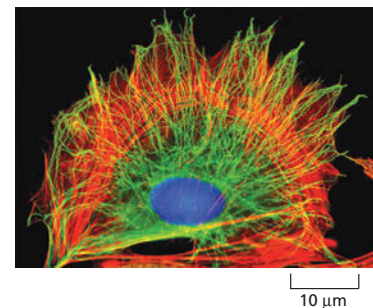



Figura 17-1 **O citoesqueleto dá à célula sua forma e permite que a célula organize seus componentes.** Uma célula animal em cultura foi marcada para mostrar dois de seus principais sistemas citoesqueléticos, os microtúbulos (*verde*) e os filamentos de actina (*vermelho*). O DNA no núcleo está marcado em *azul*. (Cortesia de Albert Tousson.)

O citoesqueleto é construído a partir de uma base composta por três tipos de filamentos proteicos: *filamentos intermediários*, *microtúbulos* e *filamentos de actina*. Como pode ser visto no **Painel 17-1** (p. 573), cada tipo de filamento apresenta propriedades mecânicas distintas e é formado por subunidades proteicas diferentes. Uma família de proteínas fibrosas forma os filamentos intermediários; a *tubulina* é a subunidade dos microtúbulos, e a *actina* é a subunidade dos filamentos de actina. Em cada caso, milhares de subunidades se organizam, formando uma fina trama de proteínas que algumas vezes se estende por toda a célula.

Neste capítulo, consideraremos a estrutura e a função dos três tipos de redes de filamentos proteicos. Iniciaremos com os filamentos intermediários, que fornecem resistência mecânica às células. Veremos, a seguir, como apêndices celulares construídos a partir de microtúbulos impulsionam células móveis, como protozoários e espermatozoides, e como o citoesqueleto de actina fornece a força motriz para a migração de fibroblastos. Finalmente, discutiremos como o citoesqueleto dirige uma das mais aparentemente óbvias e bem estudadas formas de movimento celular: a contração muscular.

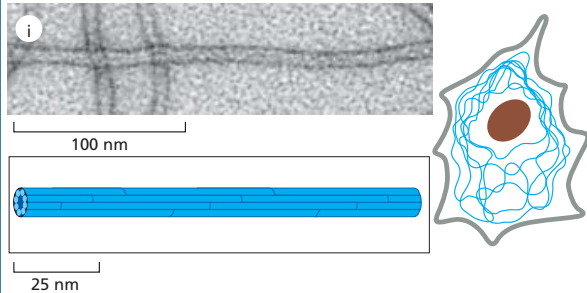
FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

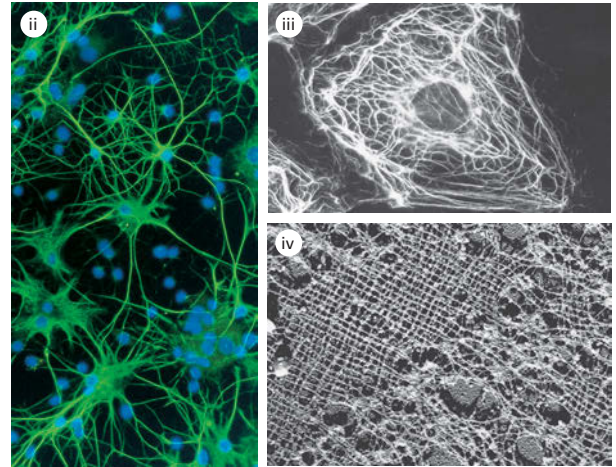
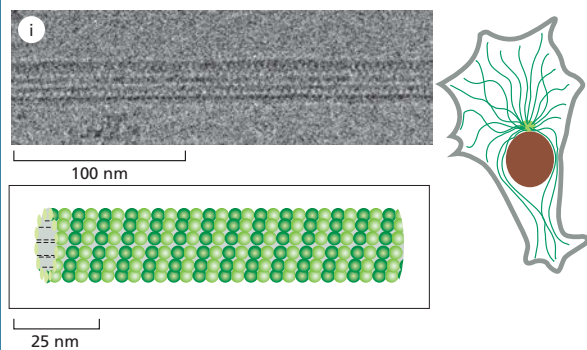
Os **filamentos intermediários** apresentam uma grande resistência à tensão, e sua função principal é permitir que as células resistam ao estresse mecânico ocasionado quando essas são distendidas. Esses filamentos são denominados "intermediários", pois, nas células musculares lisas, as células nas quais foram originalmente identificados, seu diâmetro (aproximadamente 10 nm) se encontra entre o diâmetro dos delgados filamentos que contêm actina e aquele dos espessos filamentos de miosina. Os filamentos intermediários são os mais resistentes e duráveis dos três tipos de filamentos citoesqueléticos: quando células são tratadas com soluções salinas concentradas e detergentes não iônicos, os filamentos intermediários permanecem intactos, ao passo que a maior parte do citoesqueleto restante é destruída.

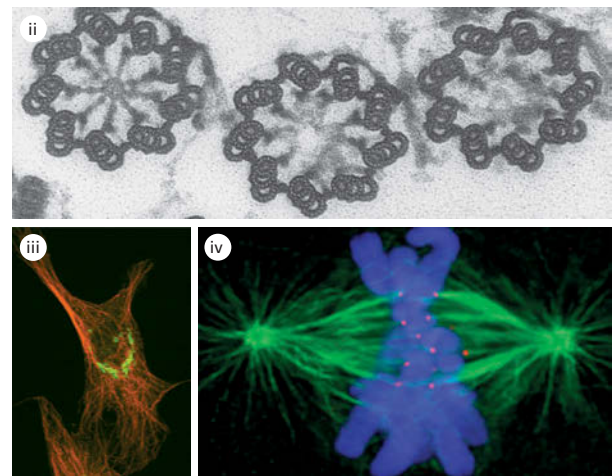
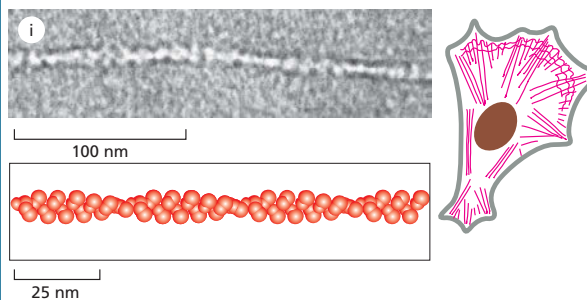
Os filamentos intermediários são encontrados no citoplasma da maioria das células animais. Eles formam caracteristicamente uma rede através do citoplasma, envolvendo o núcleo e se estendendo rumo à periferia da célula. Na periferia, estão frequentemente ancorados na membrana plasmática em junções célula-célula como os desmossomos (discutidos no Capítulo 20), onde a face externa da membrana está conectada à membrana de uma outra célula (**Figura 17-2**). Os filamentos intermediários são também encontrados no interior do núcleo; uma trama de

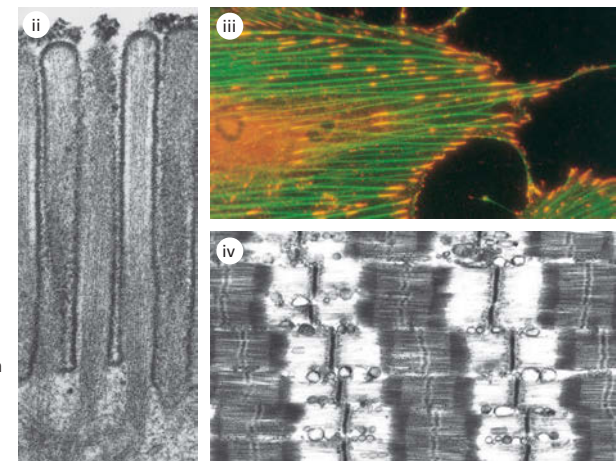
Figura 17-2 Filamentos intermediários formam uma rede resistente e durável no citoplasma da célula. (A) Microfotografia de imunofluorescência de uma camada de células epiteliais em cultura coradas para mostrar a rede de filamentos intermediários de queratina (*verde*) que envolve os núcleos e se estende através do citoplasma das células. Os filamentos de cada célula estão indiretamente conectados aos das células vizinhas através de desmossomos (discutidos no Capítulo 20), estabelecendo uma ligação mecânica contínua entre as células, através do tecido. Essa ligação mecânica fortalece o epitélio, permitindo que suas células formem uma camada contínua de tecido de revestimento de cavidades. Uma segunda proteína (*azul*) foi corada para revelar a localização dos limites celulares. (B) Esquema realizado a partir de microfotografia eletrônica de uma secção de epiderme mostrando os feixes de filamentos intermediários que atravessam o citoplasma e que estão inseridos nos desmossomos. (A, cortesia de Kathleen Green e Evangeline Amargo. B, de R. V. Krsti´c, Ultrastructure of the Mammalian Cell: An Atlas. Berlim: Springer, 1979. Com permissão de Springer-Verlag.)

PAINEL 17-1 Os três principais tipos de filamentos proteicos

FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

Filamentos intermediários são fibras semelhantes a cabos com um diâmetro de aproximadamente 10 nm; eles são compostos por proteínas de filamentos intermediários, as quais pertencem a uma grande e heterogênea família. Um determinado tipo de filamento intermediário forma uma trama denominada lâmina nuclear logo abaixo da membrana nuclear interna. Outros tipos se estendem através do citoplasma e conferem resistência mecânica às células. No tecido epitelial, eles atravessam o citoplasma de uma junção célula-célula à outra, reforçando, dessa forma, o epitélio como um todo.

Microfotografias cortesia de Roy Quinlan (i); Nancy L. Kedersha (ii); Mary Osborn (iii); Ueli Aebi (iv).

MICROTÚBULOS

Microtúbulos são longos cilindros ocos formados pela proteína tubulina. Apresentando um diâmetro externo de 25 nm, eles são muito mais rígidos do que os filamentos de actina (abaixo). Os microtúbulos são longos e retilíneos e caracteristicamente apresentam uma das extremidades ligada a um único centro organizador de microtúbulos (MTOC) denominado *centrossomo*.

Microfotografias, cortesia de Richard Vade (i); D.T. Woodrum e R.W. Linck (ii); David Shima (iii); Arshad Desai (iv).

FILAMENTOS DE ACTINA

Filamentos de actina (também conhecidos como *microfilamentos*) são polímeros helicoidais dupla-hélice da proteína actina. Eles se apresentam sob a forma de estruturas flexíveis, com diâmetro de 5-9 nm, e estão organizadas em uma ampla variedade de feixes lineares, redes bidimensionais e géis tridimensionais. Apesar de os filamentos de actina estarem dispersos por toda a célula, eles se encontram em maior concentração no córtex, logo abaixo da membrana plasmática.

Microfotografias, cortesia de Roger Craig (i e iv); P.T. Matsudaira e D.R. Burgess, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 46:845-854, 1982. Com permissão de Cold Spring Harbor Laboratory Press (ii); Keith Burridge (iii).

filamentos intermediários, a *lâmina nuclear*, reveste e fortalece o envelope nuclear em todas as células eucarióticas. Nesta seção, veremos como a estrutura e a organização dos filamentos intermediários os tornam particularmente adaptados para o fortalecimento das células e para a proteção delas contra o estresse mecânico.

Os filamentos intermediários são resistentes e semelhantes a cordas

Os filamentos intermediários são semelhantes a cordas (ou cabos), com várias fitas longas trançadas entre si para fornecer resistência à tensão (**Animação 17.1**). As fitas desse cabo – as subunidades dos filamentos intermediários – são proteínas fibrilares alongadas, cada uma composta por uma cabeça globular N-terminal, uma cauda globular C-terminal e um domínio central alongado, em forma de bastão (**Figura 17-3A**). O domínio em bastão consiste em uma região α-hélice estendida que permite que o pareamento de proteínas de filamentos intermediários forme dímeros estáveis através do enrolamento de um dímero sobre o outro, sob uma configuração supertorcida (Figura 17-3B), como descrito no Capítulo 4. A seguir, dois desses dímeros supertorcidos se associam, por meio de ligações não covalentes, para a formação de um tetrâmero (Figura 17-3C), e, posteriormente, os tetrâmeros se ligam uns aos outros por suas extremidades, lateralmente, e também via ligações não covalentes, gerando o filamento intermediário final semelhante a um cabo (Figura 17-3D-F).

Figura 17-3 Filamentos intermediários são estruturas semelhantes a cabos formadas por longas fitas proteicas enroladas. O monômero proteico do filamento intermediário mostrado em (A) consiste em um domínio central em bastão com regiões globulares em ambas as extremidades. Pares de monômeros se associam para a formação de um dímero (B), e dois dímeros se alinham para formar um tetrâmero antiparalelo (C). Os tetrâmeros podem organizar-se por meio do contato de suas extremidades, como ilustrado em (D), e unir-se em um arranjo helicoidal contendo oito fitas de tetrâmeros (aqui representado sob uma forma plana para maior clareza), que gera o filamento intermediário final, semelhante a um cabo (E). (F) Uma microfotografia eletrônica do filamento final de 10 nm. (F, cortesia de Roy Quinlan.)

Figura 17-4 Filamentos intermediários dão resistência às células animais. Se uma camada de células epiteliais é distendida por forças externas (em virtude do crescimento ou do movimento dos tecidos adjacentes, por exemplo), a rede de filamentos intermediários e junções desmossomais que se estende através da camada se tensiona e limita a extensão do estiramento. Se apenas as junções estivessem presentes, as mesmas forças aplicadas sobre o tecido provocariam uma grande deformação nas células, podendo inclusive ocasionar a ruptura das membranas plasmáticas.

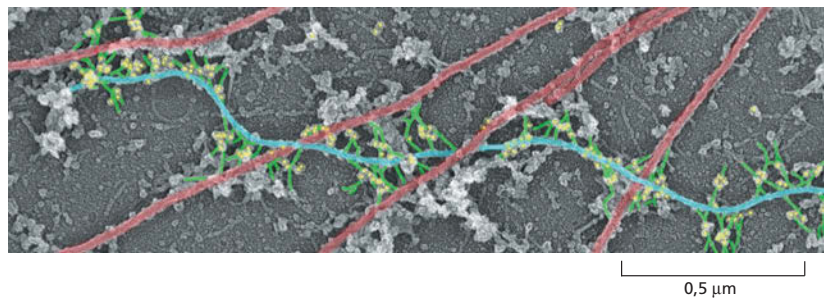
Os domínios centrais em bastão das diferentes proteínas de filamentos intermediários são similares tanto em tamanho quanto em sequência de aminoácidos, de tal forma que, quando empacotadas em conjunto, sempre formam filamentos de diâmetro e estrutura interna semelhantes. Em contraste, a cabeça globular e as regiões da cauda, que estão expostas na superfície do filamento, permitem que esse interaja com outros componentes do citoplasma. Os domínios globulares apresentam uma enorme diversidade, tanto em tamanho quanto em sequência de aminoácidos, entre uma proteína de filamento intermediário e outra.

Os filamentos intermediários tornam as células mais resistentes a estresses mecânicos

Os filamentos intermediários estão particularmente presentes no citoplasma de células que são submetidas a estresses mecânicos. Eles estão presentes em grande número, por exemplo, ao longo do comprimento dos axônios das células nervosas, fornecendo um reforço interno essencial para essas extensões celulares extremamente finas e longas. Eles também são encontrados em abundância em células musculares e em células epiteliais, como as células da pele. Em todas essas células, os filamentos intermediários, pelo seu estiramento e pela distribuição do efeito de forças aplicadas localmente, evitam que as células e suas membranas rompam em resposta à tração mecânica (**Figura 17-4**). Um princípio semelhante é utilizado para a produção de materiais compostos, como o concreto armado ou a fibra de vidro, nos quais elementos lineares de sustentação de tensão, como fibras de carbono (na fibra de vidro), ou barras de aço (no concreto), são inseridos em uma matriz para dar resistência ao material.

Os filamentos intermediários podem ser agrupados em quatro classes: (1) *filamentos de queratina* em células epiteliais; (2) *filamentos de vimentina* e *relacionados à vimentina* em células do tecido conectivo, células musculares e células de sustentação do sistema nervoso (células da neuróglia); (3) *neurofilamentos* em neurônios, e (4) *laminas nucleares*, que fortalecem a membrana nuclear de todas as células animais (**Figura 17-5**). Os três primeiros tipos de filamentos são encontrados no citoplasma, e o quarto tipo, no núcleo celular. Os filamentos

Figura 17-5 Filamentos intermediários podem ser divididos em várias categorias diferentes.

Figura 17-6 **A plectina auxilia a formação de feixes de filamentos intermediários e conecta esses filamentos a outras redes proteicas do citoesqueleto.** A plectina (em *verde*) liga os filamentos intermediários (em *azul*) a outros filamentos intermediários, a microtúbulos (em *vermelho*) e a filamentos de actina (não ilustrados). Nesta microfotografia eletrônica, os *pontos amarelos* são partículas de ouro ligadas a anticorpos que reconhecem plectina. A rede de filamentos de actina foi removida para revelar essas ligações proteicas. (De T.M. Svitkina e G.G. Borisy, *J.Cell Biol.* 135:991-1007,1996. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

de cada uma dessas classes são formados pela polimerização de suas respectivas subunidades proteicas.

A mais diversificada classe de filamentos intermediários é a das queratinas. Cada tipo de epitélio no corpo de um vertebrado – seja na língua, na córnea ou no revestimento do intestino – possui sua própria e distinta mistura de proteínas queratina. Queratinas especializadas também ocorrem nos pelos, nas penas e nas unhas. Em cada caso, os filamentos de queratina são formados por uma mistura de diferentes subunidades de queratina. Os filamentos de queratina tipicamente se estendem no interior das células epiteliais de um lado a outro, conectando-se indiretamente aos filamentos das células epiteliais adjacentes por junções célula-célula denominadas *desmossomos* (ver Painel 17-1, p.573). As extremidades dos filamentos de queratina estão ancoradas aos desmossomos e se associam lateralmente a outros componentes celulares pelos domínios de cabeça globular e de cauda, que se projetam da superfície do filamento organizado. Essa fiação de alta resistência à tensão, formada pelos filamentos ao longo da camada epitelial, distribui o estresse formado quando a pele é esticada. A importância dessa função é ilustrada por uma rara doença genética em humanos, denominada *epidermólise bolhosa simples*, na qual mutações em genes da queratina interferem na formação dos filamentos de queratina da epiderme. Como consequência, a pele fica extremamente vulnerável a lesões mecânicas, e mesmo uma pressão leve pode levar à ruptura de células e à formação de bolhas na pele.

Vários dos filamentos intermediários são ainda estabilizados e reforçados por proteínas acessórias, como a plectina, que interligam os feixes de filamentos formando fortes arranjos. Além de manter unidos os feixes de filamentos intermediários (especialmente os de vimentina), essas proteínas conectam os filamentos intermediários a microtúbulos, a filamentos de actina e a estruturas adesivas nos desmossomos (**Figura 17-6**). Mutações no gene da plectina levam a uma doença terrível em humanos que combina as características da epidermólise bolhosa simples (causada pela ruptura da queratina da pele), distrofia muscular (causada pela ruptura de filamentos intermediários nos músculos) e neurodegeneração (causada pela ruptura de neurofilamentos). Camundongos que não possuem um gene funcional de plectina morrem poucos dias após seu nascimento, apresentando a pele enrugada, em bolhas e alterações da musculatura esquelética e cardíaca. Assim, apesar de a plectina não ser necessária para a formação inicial dos filamentos intermediários, sua ação de interligação é essencial para fornecer às células a resistência necessária para enfrentar os estresses mecânicos inerentes à vida de um vertebrado.

QUESTÃO 17-1

Quais dos seguintes tipos de células apresentados você esperaria que contivessem a maior densidade de filamentos intermediários em seu citoplasma? Explique sua resposta.

A. *Amoeba proteus* (uma ameba de vida livre)
B. Célula epitelial da pele
C. Célula da musculatura lisa no trato digestório
D. *Escherichia coli*
E. Célula nervosa da medula espinal
F. Espermatozoide
G. Célula vegetal

O envelope nuclear é sustentado por uma rede de filamentos intermediários

Se os filamentos intermediários citoplasmáticos formam estruturas semelhantes a cordas, os filamentos intermediários que revestem e fortalecem a superfície interior da membrana nuclear interna estão organizados sob a forma de uma rede bidimensional (**Figura 17-7**). Os filamentos intermediários que compõem essa forte **lâmina nuclear*** são formados a partir de uma classe de proteínas

* N. de T. Não confundir as *laminas* com lâminas.

Figura 17-7 **Filamentos intermediários suportam e dão resistência ao envelope nuclear.** (A) Corte esquemático através de um envelope nuclear. Os filamentos intermediários da lâmina nuclear, revestem a face interna do envelope nuclear e acredita-se que forneçam sítios de ancoramento para a cromatina, a qual contém o DNA. (B) Microfotografia eletrônica de uma porção de lâmina nuclear de um ovo de sapo, ou oócito. A lâmina forma um padrão quadriculado de filamentos intermediários compostos de laminas. (As lâminas nucleares de outros tipos celulares nem sempre se encontram tão regularmente organizadas como as aqui apresentadas.) (B, cortesia de Ueli Aebi.)

de filamentos intermediários denominados *laminas* (não confundir com a *laminina*, que é uma proteína da matriz extracelular). Em contraste aos filamentos intermediários citoplasmáticos bastante estáveis encontrados em muitas células, os filamentos intermediários da lâmina nuclear se dissociam e se reagrupam a cada divisão celular, quando o envelope nuclear é dissociado durante a mitose e reorganizado em cada célula-filha (discutido no Capítulo 18).

A dissociação e a reorganização da lâmina nuclear são controladas pela fosforilação e defosforilação (discutidas no Capítulo 4) das laminas via proteína-cinases. Quando as laminas são fosforiladas, as alterações conformacionais resultantes enfraquecem a ligação entre os tetrâmeros e fazem com que o filamento se dissocie. A defosforilação que ocorre no final da mitose promove a reassociação das laminas (ver Figura 18-31).

Defeitos em um tipo específico de laminas estão associados a certos tipos de *progéria* – doenças raras que levam os indivíduos afetados a apresentarem um envelhecimento prematuro. Crianças com progéria possuem pele enrugada, perdem os dentes e cabelos e frequentemente desenvolvem doenças cardiovasculares severas ainda na adolescência. Apesar de os pesquisadores ainda não compreenderem como a ausência das laminas nucleares leva a esses sintomas, já foi sugerido que a instabilidade nuclear resultante dessa ausência pode levar a uma divisão celular inadequada ou a uma capacidade diminuída de reparo tecidual.

MICROTÚBULOS

Os **microtúbulos** desempenham um papel essencial na organização de todas as células eucarióticas. Eles são tubos proteicos longos e ocos relativamente rígidos que podem rapidamente sofrer dissociação em um determinado local e reassociação em outro. Em uma célula animal típica, os microtúbulos crescem a partir de uma pequena estrutura posicionada próximo ao centro da célula, denominada *centrossomo* (**Figura 17-8A**). Ao se estenderem rumo à periferia celular, os microtúbulos criam um sistema de vias dentro da célula ao longo do qual vesículas, organelas e outros componentes celulares serão transportados. Essas vias e outros sistemas de microtúbulos citoplasmáticos correspondem à porção do citoesqueleto predominantemente responsável pelo ancoramento de organelas delimitadas por membrana dentro da célula e pela condução do transporte intracelular.

Quando uma célula entra em mitose, os microtúbulos citoplasmáticos se dissociam e a seguir se reassociam sob a forma de uma intrincada estrutura denominada *fuso mitótico*. Como descrito no Capítulo 18, o fuso mitótico fornece a maquinaria que irá segregar os cromossomos igualmente entre as duas células-filhas momentos antes da divisão celular (Figura 17-8B). Os microtúbulos podem também formar estruturas permanentes, como exemplificado pelas estruturas filiformes de batimento ritmado denominadas *cílios* e *flagelos* (Figura 17-8C). Essas estruturas se estendem a partir da superfície de diferentes células eucarióticas, que as usam ou

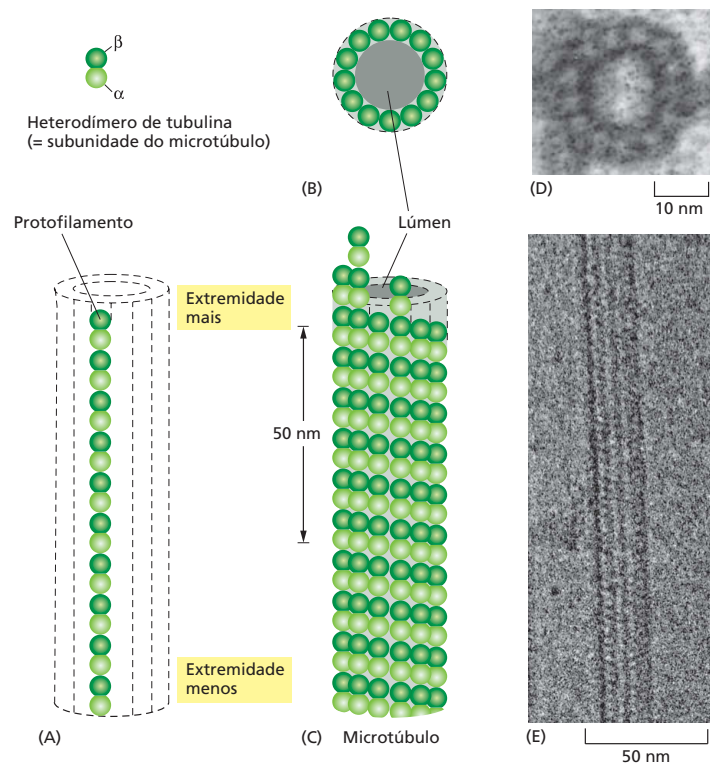
Figura 17-8 **Microtúbulos geralmente se estendem a partir de uma estrutura organizadora.** Diferentemente dos filamentos intermediários, os microtúbulos (em *verde-escuro*) se estendem a partir de um centro organizador, como (A) um centrossomo, (B) um polo do fuso ou (C) o corpo basal de um cílio.

como meio de propulsão ou para a movimentação de líquidos por sua superfície. A região central de um cílio ou flagelo eucariótico consiste em um feixe de microtúbulos estável e altamente organizado. (Os flagelos bacterianos apresentam uma estrutura completamente diferente e atuam como estruturas propulsoras por meio de mecanismos diferentes.)

Nesta seção, inicialmente, abordaremos a estrutura e a organização dos microtúbulos e então discutiremos sua função na organização do citoplasma. Essa função de organização depende da associação dos microtúbulos a proteínas acessórias, especialmente às *proteínas motoras* que propelem as organelas ao longo das vias citoesqueléticas. Finalmente, abordaremos a estrutura e o funcionamento de cílios e flagelos, nos quais os microtúbulos estão permanentemente associados a proteínas motoras que proporcionam o batimento ciliar.

Os microtúbulos são tubos ocos com extremidades estruturalmente distintas

Os microtúbulos são formados a partir de subunidades – moléculas de **tubulina** –, cada uma das quais composta por um dímero de proteínas globulares semelhantes denominadas α-*tubulina* e β-*tubulina*, ligadas fortemente entre si por ligações não covalentes. Os dímeros de tubulina, por sua vez, unem-se entre si também por meio de ligações não covalentes, para a formação da parede de um microtúbulo cilíndrico oco. Essa estrutura semelhante a um cano é um cilindro composto por 13 *protofilamentos* paralelos, cada um dos quais representado por uma cadeia linear de dímeros de tubulina com α-tubulina e β-tubulina alternadas longitudinalmente (**Figura 17-9**). Cada protofilamento apresenta uma polaridade estrutural, com a α-tubulina exposta em uma extremidade, e a β-tubulina exposta na extremidade oposta, e essa **polaridade** – a direcionalidade intrínseca da estrutura – é a mesma em todos os protofilamentos, o que resulta em uma polaridade estrutural geral no microtúbulo. Uma extremidade do microtúbulo, potencialmente a extremidade β-tubulina, é denominada *extremidade mais* (+), e a outra, a extremidade α-tubulina, é denominada *extremidade menos* (-).

Figura 17-9 Microtúbulos são tubos ocos compostos por tubulina. (A) Uma molécula de tubulina (um dímero $\alpha\beta$) e um protofilamento estão representados esquematicamente, junto a suas posições na parede de um microtúbulo. Observe que as moléculas de tubulina estão organizadas nos protofilamentos sob a mesma orientação, de tal modo que os microtúbulos apresentam uma polaridade estrutural definida. (B e C) Diagramas esquemáticos de um microtúbulo ilustrando como as moléculas de tubulina se encontram empacotadas e agrupadas na parede do microtúbulo. Na parte superior, as 13 moléculas estão representadas em secção transversal. Abaixo dessa, uma vista lateral de uma pequena secção de um microtúbulo mostra como as moléculas de tubulina estão alinhadas em protofilamentos colunares. (D) Secção transversal de um microtúbulo com seu anel de 13 distintas subunidades, cada uma das quais correspondente a um dímero separado de tubulina. (E) Microtúbulo visto longitudinalmente sob microscopia eletrônica. (D, cortesia de Richard Linck; E, cortesia de Richard Wade.)

In vitro, em uma solução concentrada de tubulina pura, os dímeros de tubulina serão adicionados a ambas as extremidades de um microtúbulo em crescimento; no entanto, eles são incorporados mais rapidamente à extremidade mais (+) do que à extremidade menos (-), sendo essa a razão pela qual as extremidades foram inicialmente assim denominadas. A polaridade do microtúbulo – o fato de sua estrutura ter uma direção definida, com duas extremidades quimicamente diferentes e que apresentam diferente comportamento – é essencial, tanto para a montagem dos microtúbulos quanto para o desempenho de suas funções após sua formação. Se eles não apresentassem polaridade, não poderiam funcionar como direcionadores do transporte intracelular, por exemplo.

QUESTÃO 17-2

Por que você acha que é muito mais fácil adicionar tubulina a microtúbulos preexistentes do que dar início a um microtúbulo inteiramente novo a partir do zero? Explique como a γ-tubulina no centrossomo auxilia a superar essa dificuldade.

O centrossomo é o principal centro organizador de microtúbulos em células animais

Nas células, os microtúbulos são formados por expansão e crescimento a partir de centros organizadores especializados, que controlam o número de microtúbulos, seu posicionamento e sua orientação no citoplasma. Em células animais, por exemplo, o **centrossomo**, que está tipicamente presente ao lado do núcleo celular quando a célula não se encontra em mitose, organiza o arranjo de microtúbulos que irradia deste em direção à periferia, pelo citoplasma (ver Figura 17-8A). Os centrossomos contêm centenas de estruturas em forma de anel construídas a partir de um outro tipo de tubulina, a γ-tubulina, e cada anel de γ-tubulina funciona como um ponto de partida, ou *sítio de nucleação*, para o crescimento de um microtúbulo (**Figura 17-10A**). Os dímeros de αβ-tubulina são adicionados ao anel de γ-tubulina seguindo uma orientação específica, o que faz com que a extremidade menos (-) dos microtúbulos esteja inserida no centrossomo e que o crescimento ocorra apenas nas extremidades mais – ou seja, nas extremidades direcionadas para a periferia (Figura 17-10B).

Além dos anéis de γ-tubulina, o centrossomo da maioria das células animais também contém um par de **centríolos**, curiosas estruturas compostas cada uma de um arranjo cilíndrico de pequenos microtúbulos. Os centríolos não apresentam função de nucleação de microtúbulos no centrossomo (os anéis de γ-tubulina, por si, já são suficientes para essa tarefa), e sua função permanece obscura, especialmente quando consideramos que as células vegetais não os possuem. Os centríolos são, no entanto, semelhantes, se não idênticos, aos *corpos basais* que formam os centros organizadores de microtúbulos em cílios e flagelos (ver Figura 17-8C), conforme será discutido adiante neste capítulo.

Os microtúbulos necessitam de centros de nucleação como os providos pelos anéis de γ-tubulina no centrossomo, pois é muito mais difícil dar início a um microtúbulo a partir do zero, inicialmente organizando um anel de dímeros de αβ-tubulina, do que adicionar esse tipo de dímeros a uma estrutura de microtúbulo preexistente. Uma αβ-tubulina livre e purificada pode polimerizar espontaneamente *in vitro* quando sob alta concentração, mas em uma célula viva, a

Figura 17-10 A tubulina polimeriza a partir de sítios de nucleação de um centrossomo. (A) Desenho esquemático mostrando que um centrossomo consiste em uma matriz amorfa de proteínas que contém os anéis de γ-tubulina que irão nuclear o crescimento de microtúbulos. Em células animais, o centrossomo contém um par de centríolos, cada centríolo feito a partir de um arranjo cilíndrico de microtúbulos curtos. (B) Um centrossomo com microtúbulos associados. A extremidade menos (-) de cada microtúbulo está inserida no centrossomo, tendo esse microtúbulo crescido a partir de um anel de nucleação, ao passo que a extremidade mais (+) de cada microtúbulo se encontra livre no citoplasma. (C) Uma imagem reconstruída mostra um denso emaranhado de microtúbulos emanando do centrossomo em uma célula de *C. elegans*. (C, de E.T. O'Toole et al., *J.Cell Biol.* 163:451-456,2003. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

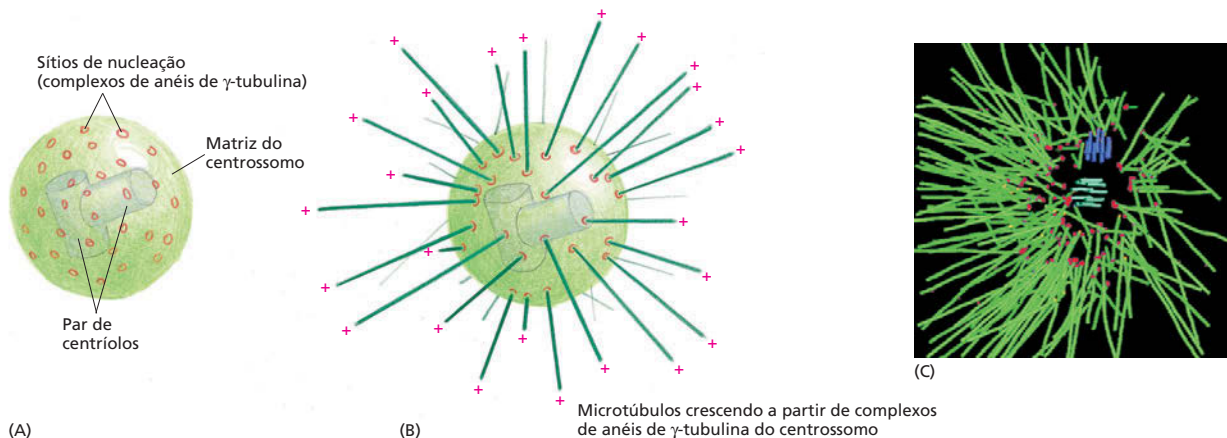
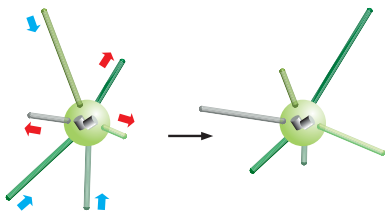



Figura 17-11 Cada filamento de microtúbulo cresce e encurta de forma independente dos microtúbulos adjacentes. O arranjo de microtúbulos ancorado em um centrossomo está em constante alteração, conforme novos microtúbulos crescem (*setas vermelhas*) e microtúbulos antigos sofrem encurtamento (*setas azuis*).

concentração de αβ-tubulina livre é demasiadamente baixa para induzir o difícil primeiro passo de montagem de um anel inicial para um novo microtúbulo. Fornecendo centros organizadores que contêm sítios de nucleação e mantendo a concentração de dímeros livres de αβ-tubulina baixa, as células podem controlar onde os microtúbulos serão formados.

Os microtúbulos em crescimento apresentam instabilidade dinâmica

Após a nucleação de um microtúbulo, sua extremidade mais (+) cresce, tipicamente, em direção à periferia, a partir do centro organizador, pela adição de subunidades de αβ-tubulina, durante vários minutos. A seguir, sem prévio aviso e repentinamente, o microtúbulo sofre uma transição que provoca seu rápido encurtamento por meio da perda de subunidades em sua extremidade livre (**Animação 17.2**). O microtúbulo pode encurtar parcialmente e, então, de forma repentina, retomar o crescimento ou então pode desaparecer completamente, sendo substituído por um novo microtúbulo que crescerá a partir do mesmo anel de γ-tubulina (**Figura 17-11**).

Esse incrível comportamento, conhecido sob o nome de **instabilidade dinâmica**, é controlado pela capacidade intrínseca que as moléculas de tubulina possuem de hidrolisar GTP. Cada dímero livre de tubulina contém uma molécula de GTP fortemente associada que é hidrolisada para GDP (ainda fortemente associada) momentos após a adição da subunidade ao microtúbulo em crescimento. As moléculas de tubulina com GTP associada se empacotam eficientemente para a formação da parede do microtúbulo, ao passo que as moléculas de tubulina que carreiam GDP apresentam uma conformação diferente e se ligam menos fortemente umas às outras.

Quando a polimerização está ocorrendo rapidamente, as moléculas de tubulina são adicionadas à extremidade do microtúbulo de forma mais rápida do que a hidrólise do GTP que elas carregam. Assim, a extremidade de um microtúbulo em crescimento é composta unicamente por subunidades de tubulina-GTP, formando o que é conhecido como um *quepe de GTP*. Nessa situação, o microtúbulo se manterá em crescimento (**Figura 17-12A**). Em virtude da aleatoriedade dos processos químicos, no entanto, ocorrerá ocasionalmente a hidrólise do GTP da tubulina presente na extremidade livre do microtúbulo antes que a próxima subunidade de tubulina seja adicionada, de tal modo que as extremidades livres dos protofilamentos serão então compostas por subunidades tubulina-GDP. Essa alteração redirecionará o balanço em favor da dissociação (Figura 17-12B). Considerando-se que o restante do microtúbulo é composto por tubulina-GDP, uma vez iniciada a despolimerização, esta tenderá a ter continuidade, frequentemente sob taxas catastróficas. O microtúbulo começará a encurtar rápida e continuamente, podendo, inclusive, desaparecer.

As moléculas de tubulina que contêm GDP e que são liberadas durante a despolimerização do microtúbulo se juntam às moléculas de tubulina não polimerizadas já presentes no citosol. Em um fibroblasto típico, por exemplo, em um momento qualquer, aproximadamente metade da tubulina celular se encontra nos microtúbulos, ao passo que a outra metade se encontra livre no citosol, formando o conjunto de subunidades disponíveis para o crescimento de microtúbulos. Essa situação difere bastante da organização dos filamentos intermediários mais estáveis, onde as subunidades estão, de forma característica, quase que completamente sob a forma totalmente associada. A seguir, as moléculas

Molécula de tubulina com GTP associado

Moléculas de tubulina GTP adicionadas à extremidade do microtúbulo

A adição procede mais rapidamente do que a hidrólise do GTP

Quepe de GTP

(A) MICROTÚBULO EM CRESCIMENTO

Protofilamentos que contém tubulina GDP se dissociam e se abrem na parede do microtúbulo

Tubulina GDP é liberada para o citosol

Molécula de tubulina com GDP associado

(B) ENCURTAMENTO DO MICROTÚBULO

Figura 17-12 A hidrólise de GTP controla o crescimento de microtúbulos. (A) Dímeros de tubulina ligados a GTP (*vermelho*) se ligam mais fortemente uns aos outros do que dímeros de tubulina ligados a GDP (*verde-escuro*). Portanto, microtúbulos que possuem dímeros de tubulina com GTP recentemente adicionados à sua extremidade tendem a manter-se em crescimento. (B) Algumas vezes, no entanto, principalmente quando o crescimento do microtúbulo é lento, as subunidades neste quepe de GTP hidrolisarão seu GTP em GDP antes que novas subunidades ligadas a GTP tenham tempo de ser incorporadas. Consequentemente, o quepe de GTP será perdido; as subunidades ligadas a GDP são menos fortemente associadas ao polímero, sendo facilmente liberadas de sua extremidade livre, de tal forma que o microtúbulo iniciará um encurtamento contínuo (**Animação 17.3** e **Animação 17.4**).

de tubulina incorporadas ao grupo de moléculas do citosol substituem seu GDP associado por GTP, tornando-se, desse modo, novamente competentes a serem adicionados a outro microtúbulo que se encontre em fase de crescimento.

Os microtúbulos são mantidos por um balanço entre associação e dissociação

A relativa instabilidade dos microtúbulos permite que eles passem por uma rápida remodelação, e esse fenômeno é essencial para o funcionamento dos microtúbulos. Em uma célula normal, o centrossomo (ou outro centro de nucleação) está continuamente enviando novos microtúbulos em diferentes direções, de forma exploratória, e retraindo-os. Um microtúbulo em crescimento a partir de um centrossomo pode, no entanto, ser impedido de sofrer dissociação se sua extremidade mais (+) estiver estabilizada permanentemente pela ligação à outra molécula ou estrutura celular que bloqueie a despolimerização da tubulina. Se houver uma estabilização pela ligação à outra estrutura existente em uma região mais distante da célula, o microtúbulo estabelecerá uma ponte relativamente estável, conectando essa estrutura ao centrossomo (**Figura 17-13**). O centrossomo pode ser comparado a um pescador que lança sua linha: se a isca não é fisgada, o pescador rapidamente recolhe a linha e torna a lançá-la; no entanto, se um peixe morder a isca, a linha permanecerá estendida, unindo o pescador e sua presa. A estratégia simples de exploração aleatória e de estabilização seletiva permite que o centrossomo e outros centros nucleadores estabeleçam um sistema altamente organizado de microtúbulos que conecta regiões específicas da célula. Esse mesmo sistema é utilizado para posicionar as organelas, umas em relação às outras.

Fármacos que impedem a polimerização ou a despolimerização da tubulina podem promover um rápido e profundo efeito sobre a organização do citoesqueleto – e no comportamento celular. Considere o fuso mitótico, o conjunto de microtúbulos que guia os cromossomos durante a mitose (ver Figura 17-8B). Se uma célula em mitose é exposta ao fármaco *colchicina*, que se liga fortemente à tubulina livre e evita que essa se polimerize para a formação de microtúbulos, o fuso mitótico rapidamente desaparece, e a célula fica bloqueada no meio da mitose, incapaz de separar seus cromossomos em dois grupos. Isso mostra que o fuso mitótico é normalmente mantido por um balanço entre a adição e a perda de subunidades de tubulina: quando a adição de tubulina é bloqueada pela colchicina, a perda de tubulina continua até que o fuso desapareça.

O fármaco *taxol* apresenta atuação oposta em nível molecular. Ele se liga fortemente aos microtúbulos e evita que eles percam subunidades. Visto que novas subunidades ainda podem ser adicionadas, os microtúbulos podem crescer, mas não podem sofrer encurtamento. No entanto, apesar das diferenças em nível molecular, o taxol terá o mesmo efeito geral sobre a célula que a colchicina: ele também bloqueia as células em divisão na mitose. Assim, podemos aprender, a partir dessas informações, que, para o funcionamento do fuso, os microtúbulos devem ser capazes não somente de se associarem, como também de se dissociarem. O comportamento do fuso é apresentado mais detalhadamente no Capítulo 18, quando consideramos a mitose.

A inativação ou a destruição do fuso mitótico leva à morte da célula em divisão. Células cancerosas, que estão se dividindo sob um menor controle do que outras células do organismo, podem ser preferencialmente mortas por *medicações antimitóticas* estabilizadoras ou desestabilizadoras de microtúbulos. Assim,

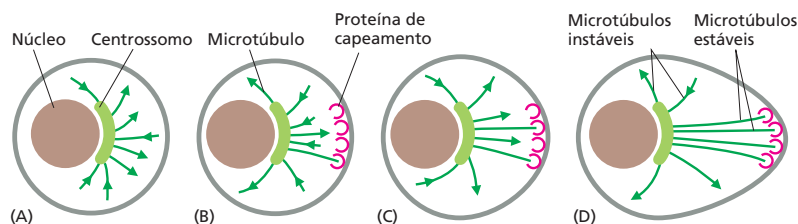



Figura 17-13 A estabilização seletiva de microtúbulos pode polarizar uma célula. Um microtúbulo recém-formado somente persistirá se suas duas extremidades estiverem protegidas contra a despolimerização. Nas células, as extremidades menos (-) dos microtúbulos geralmente estão protegidas pelos centros organizadores a partir dos quais esses microtúbulos crescem. As extremidades mais (+) estão inicialmente livres, mas podem ser estabilizadas por outras proteínas. No exemplo, uma célula não polarizada está representada em (A) com novos microtúbulos crescendo e encurtando em diferentes direções, aleatoriamente, a partir de um centrossomo. Alguns desses microtúbulos, ao acaso, encontram proteínas (proteínas de capeamento) em uma região específica do córtex celular, que podem ligar-se e estabilizar suas extremidades mais livres (B). Essa estabilização seletiva levará a uma rápida reorientação do arranjo de microtúbulos (C) e converterá a célula para uma forma fortemente polarizada (D).

TABELA 17-1 Fármacos que afetam filamentos e microtúbulos

	Ação
Fármacos específicos para microtúbulos	
Taxol	Liga-se aos microtúbulos e os estabiliza
Colchicina, colcemida	Liga-se às subunidades e evita a polimerização
Vimblastina, vincristina	Liga-se às subunidades e evita a polimerização
Fármacos específicos para actina	
Faloidina	Liga-se aos filamentos e os estabiliza
Citocalasina	Leva ao capeamento das extremidades mais
Latrunculina	Liga-se às subunidades e evita a polimerização

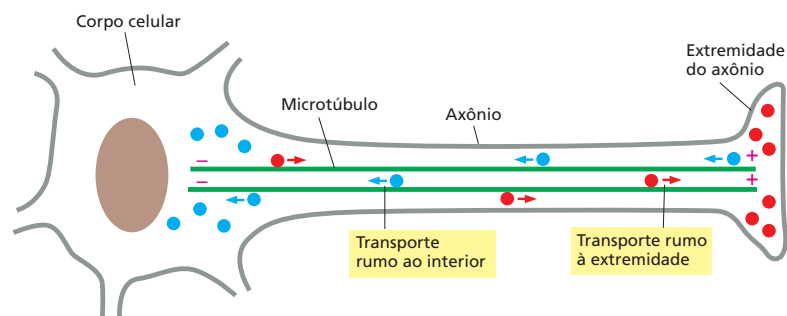
fármacos que interferem na polimerização ou na despolimerização de microtúbulos, como a colchicina, o taxol, a vincristina e a vimblastina, são usados para o tratamento clínico do câncer.

Como discutiremos a seguir, também existem compostos que estabilizam e desestabilizam os filamentos de actina. Em conjunto, esses fármacos, listados na Tabela 17-1, permitem que os biólogos estudem o funcionamento do citoesqueleto.

Os microtúbulos organizam o interior das células

As células são capazes de modificar a instabilidade dinâmica de seus microtúbulos para alcançar objetivos específicos. Quando uma célula entra em mitose, por exemplo, os microtúbulos se tornam inicialmente mais dinâmicos, intercalando entre crescimento e encurtamento com muito mais frequência do que normalmente os microtúbulos citoplasmáticos o fariam. Isso permite que eles se dissociem rapidamente e então se reassociem para a formação do fuso mitótico. Por outro lado, após a diferenciação em um tipo celular especializado e a adoção de uma estrutura fixa definida, a instabilidade dinâmica dos microtúbulos de uma célula é frequentemente suprimida por proteínas que se ligam às extremidades dos microtúbulos ou ao longo desses e os estabilizam contra a dissociação. Os microtúbulos assim estabilizados atuam na manutenção da organização celular.

A maioria das células animais diferenciadas apresenta *polarização*; ou seja, uma extremidade da célula é estrutural ou funcionalmente diferente da outra. Os neurônios, por exemplo, alongam um axônio a partir de uma extremidade celular e dendritos a partir da outra; células especializadas em secreção apresentam o complexo de Golgi posicionado rumo ao sítio de secreção, e assim por diante. A polaridade da célula é um reflexo dos sistemas de microtúbulos polarizados em seu interior, que auxiliam a posicionar as organelas nas regiões onde essas são necessárias e a guiar as vias de trânsito que se movem entre os diferentes compartimentos da célula. Em neurônios, por exemplo, todos os microtúbulos de um axônio estão posicionados na mesma direção, com suas extremidades mais direcionadas para o término do axônio (Figura 17-14). Através dessas vias orientadas,

Figura 17-14 **Os microtúbulos transportam cargas através do axônio de um neurônio.** Em neurônios, todos os microtúbulos de um axônio estão orientados na mesma direção, com suas extremidades mais direcionadas para a ponta do axônio. Os microtúbulos orientados funcionam como uma via para o transporte direcionado de materiais sintetizados no corpo celular e necessários na extremidade do axônio (como as proteínas de membrana necessárias para o crescimento). No caso de um axônio que vai da medula espinal para, digamos, um músculo do ombro, a duração do percurso é de aproximadamente dois dias. Além desse tráfego de material rumo à extremidade (círculos *vermelhos*) direcionado por um conjunto de proteínas motoras, existe um tráfego reverso (círculos *azuis*), na direção contrária, direcionado por outro conjunto de proteínas motoras. O tráfego para o interior transporta materiais ingeridos na ponta do axônio ou produzidos através da quebra de proteínas ou outras moléculas rumo ao corpo celular.

a célula é capaz de enviar cargas e materiais, como vesículas membranares e proteínas para secreção, que são sintetizados no corpo celular, mas requisitados na distante extremidade do axônio.

Alguns desses materiais se movem a velocidades que excedem 10 cm ao dia, o que significa que eles podem necessitar de uma semana ou mais para viajar até a extremidade de um longo axônio em grandes animais. No entanto, o movimento ao longo de microtúbulos é indiscutivelmente mais rápido e eficiente do que a difusão livre. Uma molécula proteica se movimentando por difusão livre poderia levar anos para alcançar a extremidade de um longo axônio, isso se considerando que ela seria capaz de completar o percurso (ver Questão 17-12).

É importante notar, no entanto, que os microtúbulos nas células vivas não atuam isoladamente. O seu funcionamento, assim como o de outros filamentos citoesqueléticos, depende de uma ampla variedade de proteínas acessórias, as quais se ligam aos microtúbulos. Algumas proteínas associadas aos microtúbulos, por exemplo, estabilizam essas estruturas contra a dissociação, ao passo que outras conectam os microtúbulos a outros componentes celulares, incluindo-se aqui outros filamentos citoesqueléticos. Outras proteínas associadas aos microtúbulos são as proteínas motoras, que transportam organelas, vesículas e outros materiais celulares ao longo dos microtúbulos. Visto que os componentes do citoesqueleto podem interagir uns com os outros, seu funcionamento pode ser coordenado.

QUESTÃO 17-3

A instabilidade dinâmica faz com que os microtúbulos cresçam ou encurtem rapidamente. Considere um microtúbulo individual que está em sua fase de encurtamento.

A. O que deve acontecer na extremidade do microtúbulo para que ele pare de encurtar e dê início ao crescimento?

B. Como uma alteração nas concentrações de tubulina afetaria essa mudança?

C. O que aconteceria se apenas GDP estivesse presente na solução, estando GTP ausente?

D. O que aconteceria se a solução contivesse um análogo de GTP que não pudesse ser hidrolisado?

As proteínas motoras direcionam o transporte intracelular

Se uma célula viva é observada sob microscopia óptica, seu citoplasma se apresenta em constante movimento (**Figura 17-15**). As mitocôndrias, as vesículas e as organelas menores delimitadas por membrana se movem por meio de pequenos e abruptos passos – ou seja, elas se movem por um curto período, param e então recomeçam o movimento. Esse *movimento saltatório* é muito mais sustentado e direcional do que os pequenos e contínuos "movimentos brownianos" causados por alterações térmicas aleatórias. Tanto microtúbulos quanto filamentos de actina estão envolvidos em movimentos saltatórios e outros movimentos intracelulares direcionados em células eucarióticas. Em ambos os casos, esses movimentos são gerados por **proteínas motoras**, que utilizam energia derivada de ciclos repetidos de hidrólise de ATP para viajar continuamente ao longo dos filamentos de actina e dos microtúbulos em uma única direção (ver Figura 4-42). Simultaneamente, essas proteínas motoras também se ligam a outros componentes celulares e, dessa forma, transportam sua carga através dos filamentos. Uma grande quantidade de proteínas motoras já foi identificada. Elas diferem em relação ao tipo de filamento ao qual se ligam, à direção na qual se movimentam ao longo do filamento e à carga transportada.

As proteínas motoras que se movem ao longo dos microtúbulos citoplasmáticos, como os de um axônio de uma célula nervosa, pertencem a duas famílias:

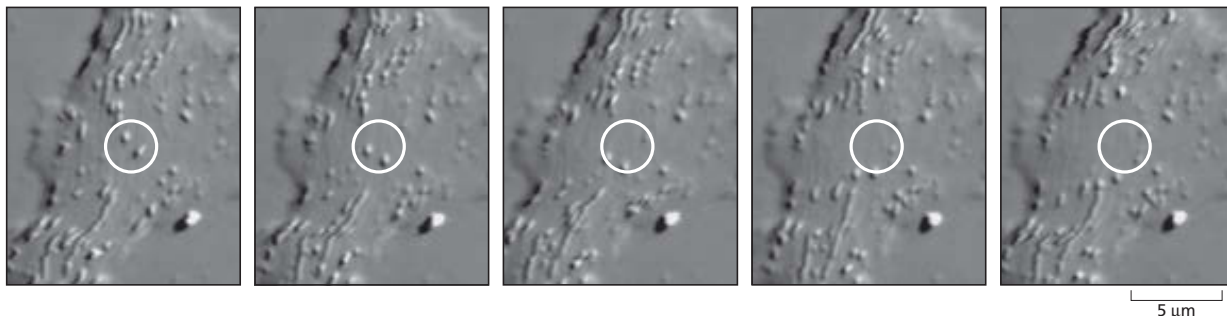
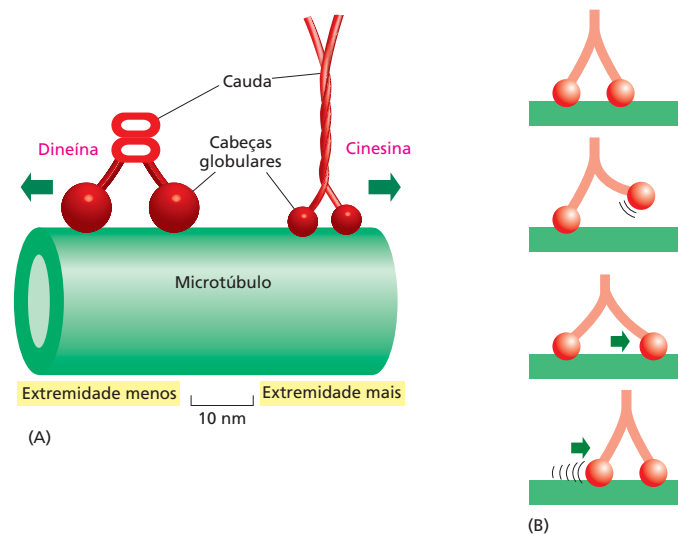



Figura 17-15 As organelas se movem ao longo dos microtúbulos em diferentes velocidades. Nessa série de imagens derivadas de um vídeo e realizadas sobre uma região aplanada de um neurônio de invertebrado, várias vesículas membranares e mitocôndrias podem ser identificadas, muitas das quais nitidamente em movimento. O *círculo branco* fornece uma referência estática. Essas imagens foram realizadas em intervalos de 400 milissegundos. (Cortesia de P. Forscher.)

Figura 17-16 Proteínas motoras se movem ao longo dos microtúbulos usando seus domínios (cabeças) globulares. (A) Cinesinas e dineínas citoplasmáticas são proteínas motoras de microtúbulo que geralmente se movem em sentidos opostos sobre esse suporte. Cada uma dessas proteínas (aqui ilustradas em escala) é um dímero composto por duas moléculas idênticas. Cada uma dessas proteínas possui duas cabeças globulares que interagem com os microtúbulos, em uma das extremidades, e uma cauda única, na outra extremidade. (B) Diagrama esquemático de uma proteína motora mostrando sua *caminhada* dependente de ATP sobre um filamento (ver também Figura 4-42).

as **cinesinas** geralmente se movem rumo à extremidade mais (+) de um microtúbulo (a partir do centrossomo; rumo à periferia na Figura 17-14), ao passo que as **dineínas** se movem em direção à extremidade menos (-) (rumo ao centrossomo; para dentro na Figura 17-14). Tanto as cinesinas quanto as dineínas são dímeros, com duas cabeças globulares de ligação ao ATP e uma cauda (Figura 17-16A). As cabeças interagem com os microtúbulos de maneira estereoespecífica, de tal forma que a proteína motora se conectará a um microtúbulo em um único sentido. A cauda de uma proteína motora geralmente se liga de forma estável a algum componente celular, tal como uma vesícula ou uma organela, e, desse modo, determina o tipo de carga que a proteína motora pode transportar (Figura 17-17). As cabeças globulares das cinesinas e dineínas são enzimas com atividade de hidrólise de ATP (ATPase). Essa reação fornece a energia para um ciclo de alterações conformacionais na cabeça que permitirá que essa se mova ao longo do microtúbulo percorrendo um ciclo de ligação, liberação e religação ao microtúbulo (ver Figura 17-16B e Figura 4-42). Para uma discussão sobre a descoberta e o estudo das proteínas motoras ver a seção Como Sabemos, p. 586-588.

As organelas se movem ao longo dos microtúbulos

Os microtúbulos e suas proteínas motoras desempenham um importante papel no posicionamento de organelas delimitadas por membrana no interior de uma célula eucariótica. Na maioria das células animais, por exemplo, os túbulos do retículo endoplasmático alcançam praticamente os limites da célula (Animação 17.5). O aparelho de Golgi, em contraste, posiciona-se no interior da célula, próximo ao centrossomo (Figura 17-18). Tanto o retículo endoplasmático quanto o aparelho de Golgi dependem dos microtúbulos para seu posicionamento e alinhamento. As membranas do retículo endoplasmático se estendem a partir de seus pontos de conexão com o envelope nuclear (ver Figura 1-22), alinhadas com microtúbulos que se estendem a partir do centrossomo rumo à membrana plasmática. Conforme a célula se desenvolve e o retículo endoplas-

Figura 17-17 Diferentes proteínas motoras transportam cargas ao longo dos microtúbulos. A maior parte das cinesinas se move em direção à extremidade mais (+) de um microtúbulo, ao passo que as dineínas se movem rumo à extremidade menos (-) (Animação 17.6). Ambos os tipos de proteínas motoras de microtúbulos ocorrem sob diferentes formas, que, supõe-se, são responsáveis pelo transporte de diferentes cargas. A cauda de uma proteína motora determina a carga que será transportada.

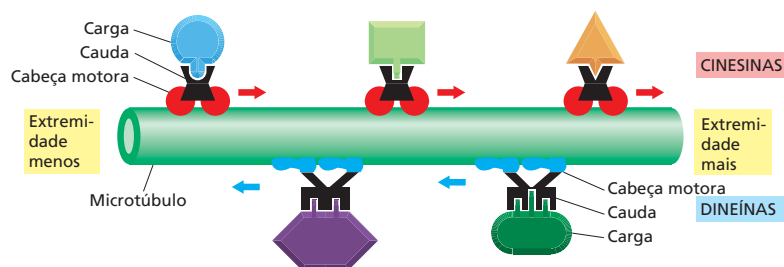
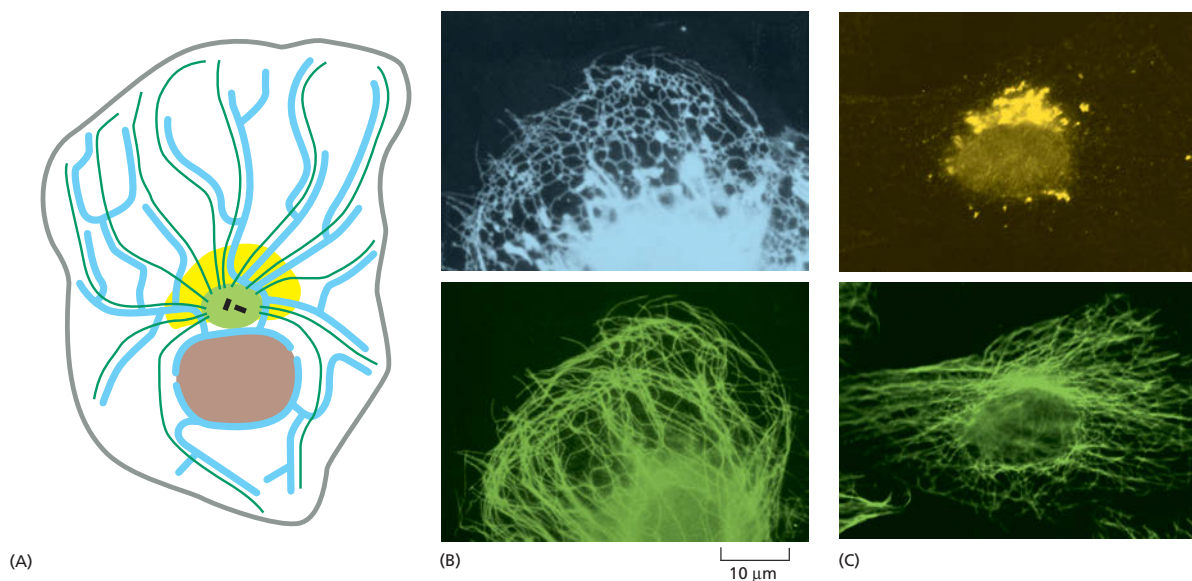



Figura 17-18 Os microtúbulos auxiliam na organização das organelas em células de eucariotos. (A) Diagrama esquemático de uma célula mostrando o arranjo típico de microtúbulos (*verde-escuro*), retículo endoplasmático (*azul*) e aparelho de Golgi (*amarelo*). O núcleo está ilustrado em *marrom*, e o centrossomo, em *verde-claro*. (B) Célula corada com anticorpos contra o retículo endoplasmático (*painel superior*) e contra microtúbulos (*painel inferior*). Proteínas motoras impulsionam o retículo endoplasmático ao longo dos microtúbulos. (C) Célula corada com anticorpos contra o aparelho de Golgi (*painel superior*) e contra microtúbulos (*painel inferior*). Nesse caso, proteínas motoras deslocam o aparelho de Golgi em direção ao interior, rumo à sua posição próximo ao centrossomo. (B, cortesia de Mark Terasaki, Lan Bo Chen e Keigi Fujiwara; C, cortesia de Viki Allan e Thomas Kreis.)

mático cresce, cinesinas ligadas à superfície externa da membrana do retículo endoplasmático (via receptores proteicos) puxam-na, esticando-a como se fosse uma rede. Dineínas, conectadas às membranas do aparelho de Golgi, puxam-no na direção oposta, ao longo dos microtúbulos, rumo ao centro da célula. Dessa forma, as diferenças regionais de posicionamento de membranas internas, sobre as quais repousa o sucesso funcional da célula, são criadas e mantidas.

Quando as células são tratadas com fármacos como a colchicina, que provocam a dissociação dos microtúbulos, ambas as organelas anteriormente citadas sofrem alterações drásticas em seu posicionamento. O retículo endoplasmático, que possui conexões com o envelope nuclear, colapsa para o centro da célula, ao passo que o aparelho de Golgi, que não se encontra ligado a qualquer outra organela, fragmenta-se em pequenas vesículas, as quais se dispersam pelo citoplasma. Quando o fármaco é removido, as organelas retornam às suas posições originais, impulsionadas por proteínas motoras que se movem ao longo dos microtúbulos reorganizados.

Os cílios e os flagelos contêm microtúbulos estáveis movimentados pela dineína

Anteriormente, neste capítulo, mencionamos que diversos microtúbulos celulares estão estabilizados por meio de sua associação a outras proteínas e que, consequentemente, não mais apresentam instabilidade dinâmica. Microtúbulos estáveis são utilizados pelas células como suportes rígidos sobre os quais são construídos diversos tipos de estruturas polarizadas, como os surpreendentes cílios e flagelos que permitem que células eucarióticas movimentem líquido sobre sua superfície. Os **cílios** são estruturas semelhantes a pelos de aproximadamente 0,25 μm de diâmetro, cobertas por membrana plasmática e que ocorrem na superfície de diversos tipos de células eucarióticas (ver Figura 17-8C). Um cílio individual contém uma região central composta por microtúbulos estáveis, organizados em um feixe, que crescem a partir de um *corpo basal* presente no citoplasma; o corpo basal atua como um centro nucleador para o cílio.

COMO SABEMOS:
PERSEGUINDO PROTEÍNAS MOTORAS

O movimento de organelas através do citoplasma de uma célula tem sido observado, medido e tem fornecido material para especulações desde aproximadamente a metade do século XIX. No entanto, foi apenas na metade da década de 1980 que os biólogos foram capazes de identificar as moléculas que direcionam esse movimento de organelas e vesículas de uma região para outra dentro da célula.

Por que esse intervalo entre a observação e a compreensão? O problema estava nas proteínas – ou, mais precisamente, na dificuldade em estudá-las de forma isolada, fora das células. Para investigar a atividade de uma enzima, por exemplo, os bioquímicos inicialmente purificam o polipeptídeo: eles rompem as células ou tecidos e separam a proteína de interesse dos demais componentes moleculares (ver Painéis 4-4 e 4-5, p. 164-167). A seguir, eles podem estudar a proteína isolada, *in vitro*, controlando sua exposição a substratos, inibidores, ATP, e assim por diante. Infelizmente, essa abordagem não parece funcionar para estudos que envolvem a maquinaria de motilidade associada ao transporte intracelular. Não é possível romper uma célula e recuperar um sistema de transporte completamente ativo, livre de materiais contaminantes, que mantenha a capacidade de transportar mitocôndrias e vesículas de um lugar a outro.

As técnicas necessárias para impulsionar as pesquisas foram provenientes de duas diferentes fontes. Inicialmente, avanços em microscopia permitiram aos biólogos identificar que um sistema de transporte operacional (com material externo ainda ligado a ele) poderia ser obtido a partir do material espremido de um tipo determinado de célula viva. Simultaneamente, os bioquímicos perceberam que poderiam montar um sistema de transporte funcional começando do zero – usando cabos, motores e cargas purificados – fora da célula. As descobertas tiveram início com uma lula.

Figura 17-19 A videomicroscopia de citoplasma espremido de um axônio gigante de lula revela o movimento de organelas. Nessa microfotografia, são vistos vários filamentos citoesqueléticos junto a partículas transportadas, inclusive uma mitocôndria (*seta vermelha*) e vesículas menores (*setas azuis*). (De R. D. Vale *et al.*, *Cell* 40:449-454, 1985. Com permissão de Elsevier.)

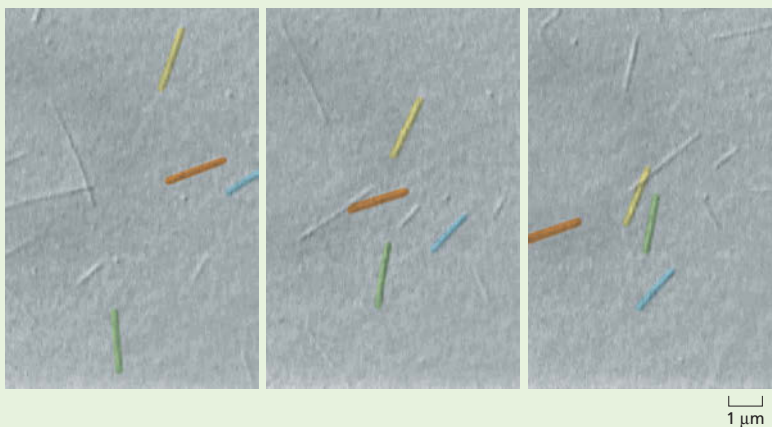
Um citoplasma borbulhante

Como vimos no Capítulo 12, neurocientistas interessados nas propriedades elétricas das membranas de células nervosas estudaram amplamente o axônio gigante de lula (ver Como Sabemos, p. 412-413). Em virtude do seu grande tamanho, os pesquisadores podiam espremer o citoplasma de um axônio, como se fosse um tubo de pasta de dentes e então estudar como os íons se moviam para dentro e para fora através dos diversos canais da membrana vazia que se assemelhava a um tubo. Os fisiologistas simplesmente descartavam o citoplasma gelatinoso, tendo em vista sua aparência inerte (e, por consequência, sem interesse) quando examinado sob microscopia óptica padrão.

No entanto, eis que surgiu a videomicroscopia. Esse tipo de microscopia, desenvolvido por Shinya Inoué, Robert Allen e outros, permite que se detectem estruturas menores do que aquelas reveladas pelo poder de resolução de um microscópio óptico padrão, ou seja, aproximadamente 0,2 μm, ou 200 nm (ver Painel 1-1, p. 8-9). Imagens amostrais são capturadas por uma câmera de vídeo e então aumentadas por processamento computadorizado para redução da interferência e realce do contraste. Quando os pesquisadores, no início da década de 1980, aplicaram essa nova técnica a preparações de citoplasma de axônio de lula (axoplasma), eles observaram, pela primeira vez, o movimento de vesículas e organelas delimitadas por membranas ao longo de filamentos citoesqueléticos.

Sob a videomicroscopia, o axoplasma que sofreu extrusão parece borbulhar com minúsculas partículas – de vesículas de 30 a 50 nm de diâmetro a mitocôndrias com aproximadamente 5.000 nm de comprimento, movendo-se em todas as direções ao longo de filamentos citoesqueléticos a velocidades de até 5 μm por segundo. Se o axoplasma for espalhado em uma espessura suficientemente fina, filamentos individuais podem ser observados (Figura 17-19).

O movimento permanece por horas, permitindo que os pesquisadores manipulem a preparação e estudem os efeitos dessas manipulações. Ray Lasek e Scott Brady descobriram, por exemplo, que o movimento de organelas requer ATP. A substituição por análogos de ATP, como o

Figura 17-20 **Uma proteína motora provoca o deslizamento de um microtúbulo.** Em um ensaio ativo de motilidade *in vitro*, cinesina purificada é misturada a microtúbulos em presença de tampão que contém ATP. Quando uma gota dessa mistura é colocada sobre uma lâmina de vidro e observada por videomicroscopia, microtúbulos individuais podem ser vistos deslizando sobre a lâmina, conduzidos pelas moléculas de cinesina. As imagens foram obtidas em intervalos de 1 segundo. (Cortesia de Nick Carter e Rob Cross.)

AMP-PNP, que se liga ao sítio ativo da enzima, mas não pode ser hidrolisado (e, portanto, não fornece energia), inibe a translocação.

Tubos serpenteantes

Foi necessário mais trabalho para a identificação dos componentes individuais que dirigiam o sistema de transporte nos axônios de lula. De que eram compostos os filamentos? Quais eram as máquinas moleculares que transportavam as vesículas e as organelas através desses filamentos? A identificação dos cabos foi relativamente simples. Estudos utilizando anticorpos dirigidos contra α-tubulina revelaram que esses filamentos eram os microtúbulos. Em relação às proteínas motoras? Com o objetivo de identificá-las, Ron Vale, Thomas Reese e Michael Sheetz desenvolveram um sistema por meio do qual seria possível "pescar" as proteínas que impulsionam o movimento de organelas.

Sua estratégia foi simples e elegante: coloque em um mesmo local cargas e cabos purificados e então procure moléculas que consigam induzir movimento. Eles pegaram microtúbulos purificados a partir do lobo óptico de lula, adicionaram organelas isoladas de axônios de lula e demonstraram que poderia ser induzido movimento pela adição de um extrato de citoplasma de axônio de lula. Nessa preparação, os pesquisadores puderam observar organelas se movimentando ao longo dos microtúbulos, e microtúbulos deslizando de uma forma serpenteante sobre a superfície de uma lamínula de vidro (ver Questão 17-18). Seu desafio era isolar a proteína responsável pelo movimento nesse sistema reconstituído.

Para essa tarefa, Vale e seus colaboradores utilizaram trabalhos anteriores de Lasek e Brady com o análogo de ATP, AMP-PNP. Apesar de esse análogo inibir o movimento de vesículas ao longo dos microtúbulos, ele ainda permitia que esses componentes se ligassem aos filamentos do microtúbulo. Assim, os pesquisadores incubaram o extrato citoplasmático com microtúbulos, na presença de AMP-PNP; a seguir, eles retiraram os microtúbulos, com o que eles tinham esperança de que estariam as proteínas motoras ainda associadas a eles. Vale e seu grupo adicionaram então ATP para liberar as proteínas associadas e encontraram um polipeptídeo de 110 quilodáltons que podia ligar-se e induzir movimento em microtúbulos *in vitro* (**Figura 17-20**). Eles denominaram essa molécula cinesina (do grego *kinein*, "mover").

Esse tipo de ensaio de motilidade *in vitro* foi utilizado para o estudo das proteínas motoras e sua atividade. Estudos posteriores revelaram que as cinesinas se movem ao longo dos microtúbulos da extremidade menos (-) rumo à extremidade mais (+) e também auxiliaram a identificar muitas outras proteínas motoras relacionadas à cinesina.

Luzes, câmera, ação

Combinando esses ensaios *in vitro* com técnicas de microscopia cada vez mais refinadas, os pesquisadores podem, atualmente, monitorar o movimento de proteínas motoras individuais ao longo de um microtúbulo isolado, mesmo em células vivas. Em um ensaio desenvolvido por Steven Block e seus colaboradores, em 1990, microscópicas esferas de sílica revestidas em baixas concentrações de cinesina (de tal modo que uma única molécula de cinesina está presente na superfície de cada esfera) puderam ser monitoradas conforme caminhavam ao longo de um microtúbulo (**Figura 17-21**). Outras observações de moléculas individuais de cinesina foram possíveis pelo acoplamento de proteínas motoras a proteínas marcadoras fluorescentes, como a GFP.

Tais estudos de moléculas individuais têm revelado que a cinesina se move ao longo dos microtúbulos progressivamente – ou seja, cada molécula realiza 100 ou mais "passos" ao longo do filamento antes de cair (**Figura 17-22**). O comprimento de cada passo equivale a

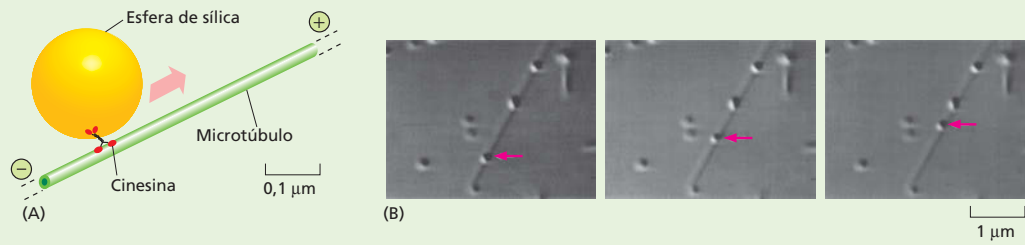



Figura 17-21 **A videomicroscopia pode ser utilizada para acompanhar o movimento de uma molécula individual de cinesina.** (A) Nesse ensaio, esferas de sílica foram colocadas em contato com moléculas de cinesina em uma concentração tal que cada esfera, em média, terá apenas uma única molécula de cinesina ligada a ela. A seguir, permite-se que a cinesina se desloque ao longo de um microtúbulo, e seu movimento é monitorado pelo acompanhamento do movimento da esfera. (B) Nessa série de imagens, a esfera é capturada por uma pinça óptica a *laser*, colocada sobre um filamento de microtúbulo e então permite-se seu movimento. Existe um intervalo igual a trinta segundos entre cada foto. (De S. Block *et al.*, *Nature* 348:348-352, 1990. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

8 nm, o que corresponde ao espaçamento dos dímeros de tubulina ao longo do microtúbulo. A combinação dessas observações com ensaios de hidrólise de ATP permitiu que pesquisadores confirmassem que uma molécula de ATP é consumida a cada passo. A cinesina pode mover-se de modo progressivo, pois possui duas cabeças (ver Figura 17-22). Acredita-se que o motor percorra seu caminho rumo à extremidade mais (+) do microtúbulo "passo a passo", cada cabeça ligando e se liberando do filamento progressivamente. Mais estudos são necessários para refinar esse modelo, e os pesquisadores estão hoje trabalhando ativamente para melhorar as metodologias de análise, de tal forma que possam observar não apenas moléculas individuais de cinesina, mas também cada cabeça isoladamente conforme ela se move, em relação à sua companheira, ao longo do microtúbulo. Os resultados irão fornecer novas informações sobre os movimentos moleculares que regulam a organização e a atividade de células eucarióticas.

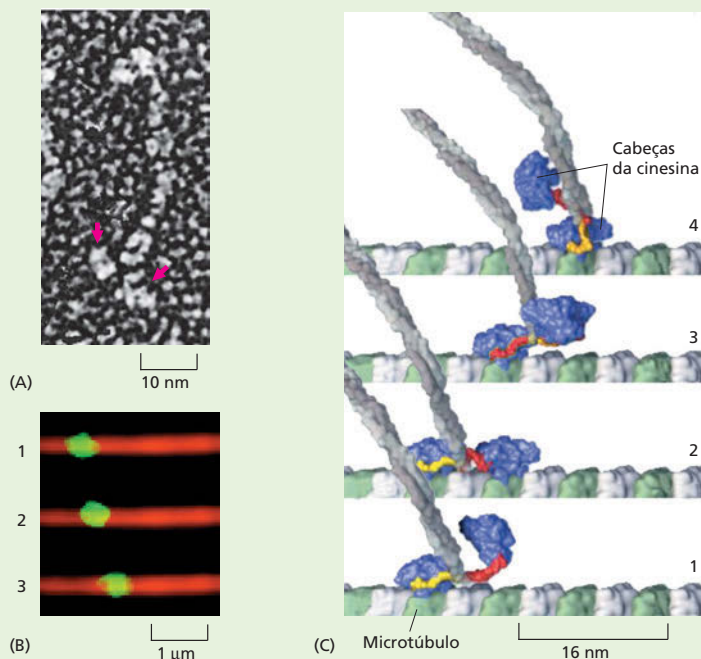



Figura 17-22 **Uma molécula individual de cinesina que se move ao longo de um microtúbulo.** (A) Microfotografia eletrônica de uma molécula individual de cinesina mostrando os dois domínios da cabeça (*setas vermelhas*). (B) Três fotografias obtidas em intervalo de 1 segundo entre cada uma delas ilustram o movimento de uma molécula individual de cinesina-GFP (*verde*) sobre um microtúbulo (*vermelho*) a uma velocidade de 0,3 µm/seg. (C) Uma série de modelos moleculares das duas cabeças de uma molécula de cinesina ilustram como foi sugerido que elas progridam sucessivamente sobre um microtúbulo, por meio de passos de 8 nm (**Animação 17.7**). (A, cortesia de John Heuser; B e C, cortesia de Ron Vale.)

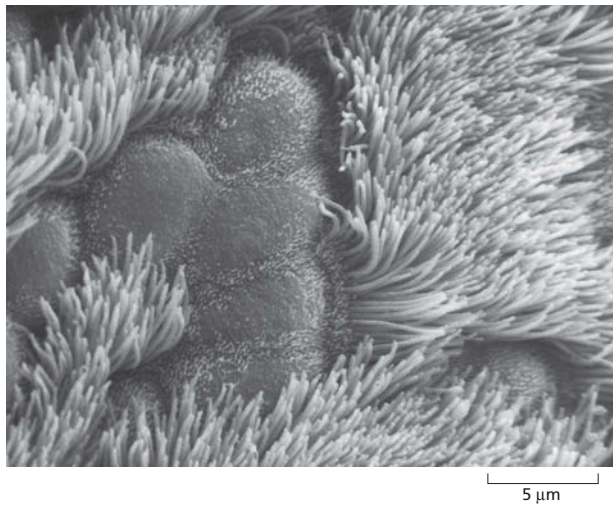



Figura 17-23 Os cílios formam uma cobertura semelhante a uma cabeleira na superfície de diversas células eucarióticas. Microfotografia eletrônica de varredura de um epitélio ciliado na superfície do trato respiratório humano. Os espessos tufos de cílios das células ciliadas estão espaçados pelas superfícies arredondadas de células epiteliais não ciliadas. (Reproduzida de R.G. Kessel e R.H. Karden, Tissues and Organs. São Francisco: W.H. Freeman & Co., 1979. Com permissão de W.H. Freeman & Co.)

Os cílios movimentam líquidos sobre a superfície da célula, ou impelem células isoladas através de um líquido. Alguns protozoários, por exemplo, utilizam cílios para a coleta de partículas de alimento, e outros os utilizam para a locomoção. Nas células epiteliais que revestem o trato respiratório humano (**Figura 17-23**), uma grande quantidade de cílios (mais de um bilhão por centímetro quadrado) varre camadas de muco que contêm partículas de poeira e células mortas aprisionadas, em direção à garganta, para serem engolidas e consequentemente eliminadas do organismo. De forma semelhante, os cílios de células da parede do oviduto criam uma corrente que auxilia a movimentação dos óvulos ao longo dessa via. Cada cílio atua como um pequeno remo, movimentando-se através de um ciclo repetitivo que gera a corrente que flui sobre a superfície das células (**Figura 17-24**).

Os **flagelos** que impulsionam os espermatozoides e diversos tipos de protozoários são bastante semelhantes aos cílios no que diz respeito à sua estrutura interna, mas, geralmente, são muito mais longos do que esses. Eles são estruturados com o objetivo de mover a célula como um todo, e em vez de gerar uma corrente, propagam ondas regulares ao longo de seu comprimento de forma a impulsionar a célula através de um líquido (**Figura 17-25**).

Os microtúbulos dos cílios e flagelos são ligeiramente diferentes daqueles encontrados no citoplasma; eles estão organizados em um padrão distinto e curioso, o qual foi uma das mais impressionantes revelações quando do surgimento da microscopia eletrônica. Uma secção em corte de um cílio mostra nove pares de microtúbulos organizados em anel, em torno de um único par de microtúbulos isolados (**Figura 17-26A**). Esse arranjo "9+2" é característico de praticamente todos os cílios e flagelos eucarióticos, desde os encontrados em protozoários até aqueles presentes em humanos.

O movimento de um cílio ou flagelo é produzido pela flexão de sua região central conforme os microtúbulos deslizam uns sobre os outros. Os microtúbulos estão associados a diversas proteínas (Figura 17-26B), que se projetam a intervalos regulares ao longo do comprimento do feixe de microtúbulos. Algumas atuam como interligadoras para a manutenção da estrutura do feixe de microtúbulos, e outras geram a força que provoca a flexão do cílio.

A mais importante dessas proteínas acessórias é a proteína motora *dineína ciliar*, que gera o movimento de flexão na região central. Ela é intimamente relacionada à dineína citoplasmática e atua de forma muito semelhante a esta. A dineína ciliar está conectada por sua cauda a um microtúbulo, ao mesmo tempo em que suas cabeças interagem com um microtúbulo adjacente para gerar a força de deslizamento entre esses dois filamentos. Tendo em vista as múltiplas ligações que mantêm os pares de microtúbulos adjacentes unidos, aquilo que deveria ser um simples movimento de deslizamento paralelo entre microtúbulos livres é convertido no movimento de curvatura (ou flexão) do cílio (**Figura 17-27**). Em humanos, defeitos he-

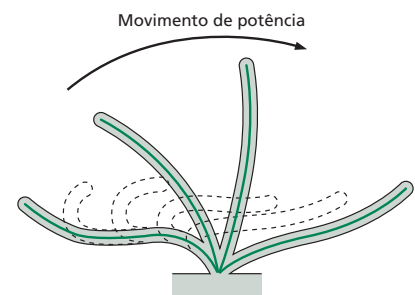



Figura 17-24 Um cílio bate através da repetição de ciclos de movimentos que consistem em um movimento de potência seguido em um movimento de recuperação. No rápido movimento de potência, o cílio se encontra totalmente distendido, e o líquido é direcionado sobre a superfície da célula. No movimento de recuperação, mais lento, o cílio se recurva em uma posição que provoca o menor distúrbio possível no líquido adjacente. Cada ciclo dura tipicamente 0,1-0,2 segundos e gera uma força perpendicular ao eixo do cílio.

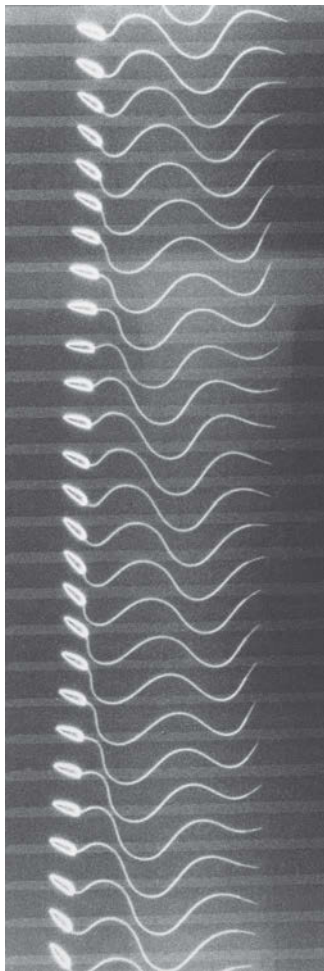



Figura 17-25 Os flagelos impulsionam uma célula através do uso de um movimento repetitivo semelhante a uma onda. O movimento de ondulação de um flagelo individual de um espermatozoide de um tunicado é apresentado em uma série de imagens obtidas por meio de iluminação estroboscópica a 400 cintilações por segundo. (Cortesia de Charles J. Brokaw.)

reditários na dineína ciliar provocam a síndrome de Kartagener. Homens com essa doença não são férteis em virtude da ausência de motilidade dos espermatozoides, e todos os indivíduos afetados apresentam aumento na suscetibilidade a infecções brônquicas, pois os cílios que revestem seu trato respiratório se encontram inativos e, portanto, incapazes de eliminar bactérias ou outros resíduos dos pulmões.

FILAMENTOS DE ACTINA

Os **filamentos de actina** são encontrados em todas as células eucarióticas e são essenciais para muitos de seus movimentos, principalmente aqueles que envolvem a superfície celular. Sem os filamentos de actina, por exemplo, uma célula animal não poderia migrar (ou deslizar) sobre uma superfície, englobar uma partícula grande por fagocitose ou dividir-se em duas. Assim como os microtúbulos, diversos filamentos de actina apresentam instabilidade, mas associando-se a outras proteínas, eles também podem formar estruturas estáveis nas células, como os complexos contráteis nos músculos. Os filamentos de actina interagem com uma grande quantidade de *proteínas de ligação à actina*, o que permite que desempenhem uma ampla gama de atividades nas células. Dependendo da sua associação a diferentes proteínas, os filamentos de actina podem formar estruturas rígidas e relativamente permanentes, como as *microvilosidades* das células com borda em escova, que revestem o intestino (Figura 17-28A), ou pequenos *feixes contráteis* no citoplasma que podem se contrair e atuar com "músculos" para uma célula (Figura 17-28B); eles também podem formar estruturas temporárias, como as protrusões dinâmicas formadas na borda anterior de um fibroblasto em migração (Figura 17-28C), ou os *anéis contráteis* que espremem o citoplasma separando as células animais em duas no momento da divisão (Figura 17-28D). Nesta seção, veremos como os arranjos de filamentos de actina em uma célula dependem dos diferentes tipos de proteínas de ligação à actina presentes.

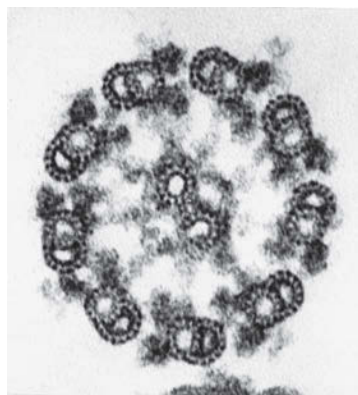
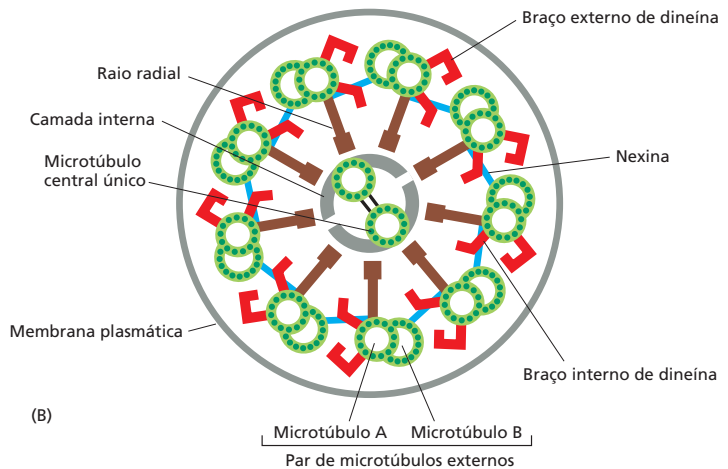



Figura 17-26 Os microtúbulos em um cílio ou flagelo estão organizados em um arranjo "9 + 2". (A) Microfotografia eletrônica de um flagelo de *Chlamydomonas* mostrado em secção transversal, ilustrando a organização 9 + 2 característica dos microtúbulos. (B) Diagrama em corte de um flagelo. Os nove microtúbulos externos (cada um sendo uma estrutura pareada específica) apresenta duas colunas de moléculas de dineína. As cabeças dessas dineínas aparecem nessa ilustração como pares de braços que se estendem em direção ao microtúbulo adjacente. Em um cílio ativo, essas cabeças de dineína periodicamente contactam o microtúbulo adjacente e se movem ao longo dele, produzindo, em consequência, a força para os batimentos ciliares. Diversas outras ligações e projeções ilustradas representam proteínas que servem para a manutenção da união do feixe de microtúbulos e para a conversão do movimento de deslizamento produzido pelas dineínas em curvatura, como ilustrado na Figura 17-27. (A, cortesia de Lewis Tilney.)

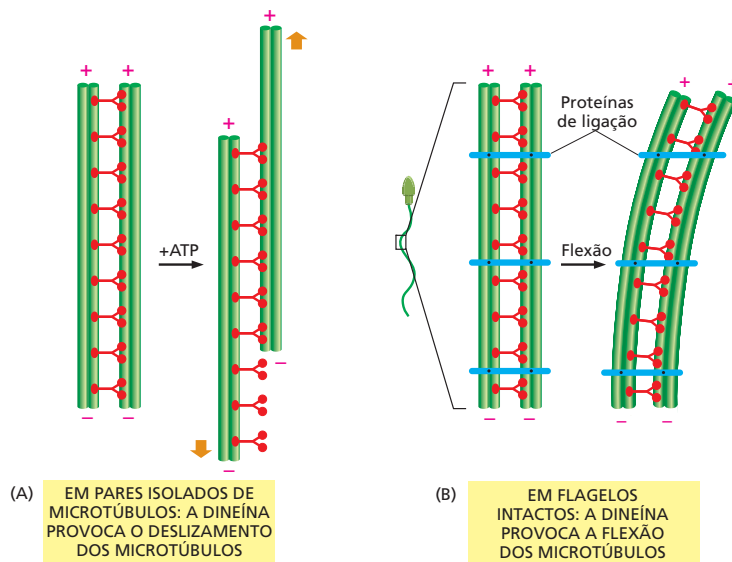



Figura 17-27 O movimento da dineína provoca a curvatura do flagelo. (A) Se os pares externos de microtúbulos e suas moléculas associadas de dineína são liberados dos outros componentes em um flagelo de um espermatozoide e a seguir são expostos a ATP, ocorre o deslizamento linear de um par de microtúbulos sobre o outro, devido à ação repetida das dineínas associadas. (B) Em um flagelo intacto, no entanto, os pares de microtúbulos estão conectados uns aos outros por meio de ligações proteicas flexíveis, de tal modo que a ação do sistema provoca um movimento de flexão, em vez de deslizamento.

Mesmo considerando-se que filamentos de actina e microtúbulos são formados a partir de proteínas não relacionadas, veremos que os princípios a partir dos quais esses se associam e se dissociam, controlam a estrutura celular e permitem a existência de movimento são extremamente similares.

QUESTÃO 17-4

Os braços de dineína em um cílio estão arranjados de tal forma que, quando ativados, suas cabeças impulsionam os pares vizinhos externos para fora, em direção à extremidade do cílio. Considere uma secção de um cílio (ver Figura 17-26). Por que não haveria formação de movimento de flexão no cílio se todas as moléculas de dineína fossem ativadas simultaneamente? Que padrão de atividade de dineína pode ser responsável pela flexão de um cílio em uma direção?

Os filamentos de actina são finos e flexíveis

Os filamentos de actina são visualizados sob microscopia eletrônica como fitas de aproximadamente 7 nm de diâmetro. Cada filamento é composto por uma cadeia espiralada de moléculas idênticas de actina globular, todas "apontando" para a mesma direção em relação ao eixo da cadeia. Assim, do mesmo modo que um microtúbulo, um filamento de actina apresenta uma polaridade estrutural, com uma extremidade mais (+) e uma extremidade menos (-) (**Figura 17-29**).

Os filamentos de actina são mais delgados e flexíveis e, geralmente, mais curtos do que os microtúbulos. No entanto, existem muito mais filamentos individuais de actina do que microtúbulos em uma célula; desse modo, o comprimento total dos filamentos de actina de uma célula é muitas vezes superior ao comprimento total dos microtúbulos. Os filamentos de actina raramente ocorrem de forma isolada nas células: eles são geralmente encontrados em feixes interligados e em redes – estruturas que apresentam uma resistência muito superior se comparadas a filamentos individuais.

A actina e a tubulina polimerizam por mecanismos semelhantes

Os filamentos de actina podem crescer pela adição de monômeros de actina em ambas as extremidades; no entanto, a velocidade de crescimento é maior na extremidade mais (+) do que na extremidade menos (-). Um filamento de actina nu, assim como um microtúbulo sem suas proteínas associadas, é inerentemente

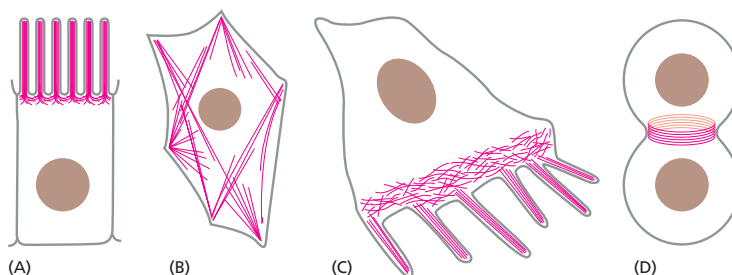
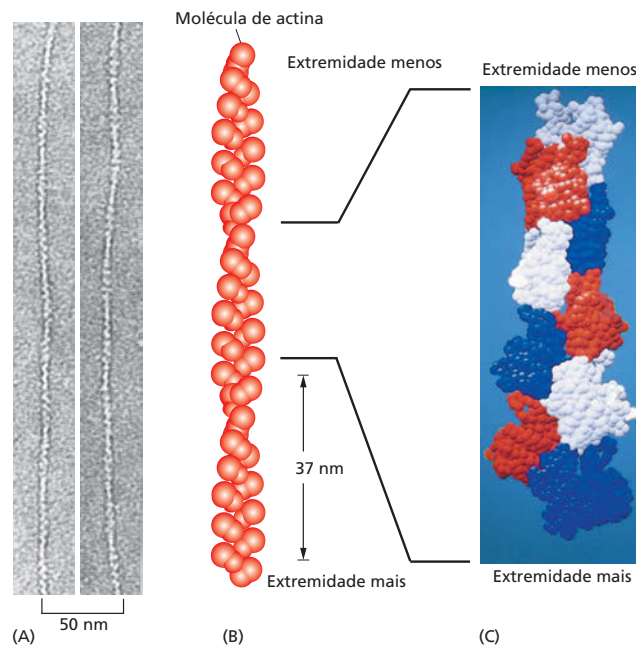



Figura 17-28 Filamentos de actina permitem que as células eucarióticas adotem uma grande variedade de formas e desempenhem diferentes funções. Em *vermelho*, estão ilustradas diferentes estruturas que contêm actina: (A) microvilosidades; (B) feixes contráteis no citoplasma; (C) protrusões planas (*lamelipódios*) ou filiformes (*filopódios*) da borda anterior de uma célula em movimento; (D) anéis contráteis durante a divisão celular.

Figura 17-29 Os filamentos de actina são fibras proteicas finas e flexíveis. (A) Microfotografia eletrônica de filamentos de actina em coloração negativa. (B) Arranjo de moléculas de actina em um filamento. Cada filamento pode ser imaginado como uma hélice de fita dupla cuja volta completa se repete a cada 37 nm. Fortes interações entre as duas fitas evitam que essas se separem. (C) As subunidades idênticas de um filamento de actina estão ilustradas em cores diferentes para enfatizar a íntima interação entre cada molécula de actina e suas quatro moléculas adjacentes. (A, cortesia de Roger Craig; C, de K.C. Holmes *et al.*, *Nature* 347:44-49, 1990. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

instável e pode sofrer dissociação em ambas as extremidades. Cada monômero livre de actina carrega um trifosfato de nucleosídeo fortemente associado, nesse caso o ATP, o qual é hidrolisado em ADP momentos após a incorporação do monômero de actina ao filamento. Assim como o GTP da tubulina, a hidrólise do ATP em ADP no filamento de actina reduz a resistência da ligação entre os monômeros e diminui a estabilidade do polímero. Dessa forma, a hidrólise dos nucleotídeos promove a despolimerização, auxiliando a célula a dissociar os filamentos após sua formação (Figura 17-30).

Da mesma forma que ocorre com os microtúbulos, a capacidade de associação e dissociação é necessária para muitas das atividades desempenhadas pelos filamentos de actina, por exemplo, para sua atuação na locomoção celular. O desempenho dos filamentos de actina pode ser perturbado experimentalmente por certas toxinas produzidas por fungos e por esponjas marinhas. Algumas toxinas, como as *citocalasinas*, evitam a polimerização da actina; outras, como a *faloidina*, estabilizam os filamentos de actina impedindo sua despolimerização (ver Tabela 17-1, p. 582). A adição dessas toxinas ao meio de lavagem de células ou tecidos, mesmo sob concentrações reduzidas, instantaneamente bloqueia os movimentos celulares, como o movimento de deslizamento (ou migração) de um fibroblasto. Assim, a ação dos filamentos de actina depende de um equilíbrio dinâmico entre os filamentos de actina formados e o conjunto de monômeros de actina, devendo-se considerar que os filamentos frequentemente persistem por apenas alguns minutos após sua formação.

QUESTÃO 17-5

A formação de filamentos de actina no citosol é controlada por proteínas de ligação à actina. Algumas proteínas de ligação à actina aumentam significativamente a taxa de iniciação de formação de um filamento de actina. Proponha um mecanismo pelo qual isso possa ocorrer.

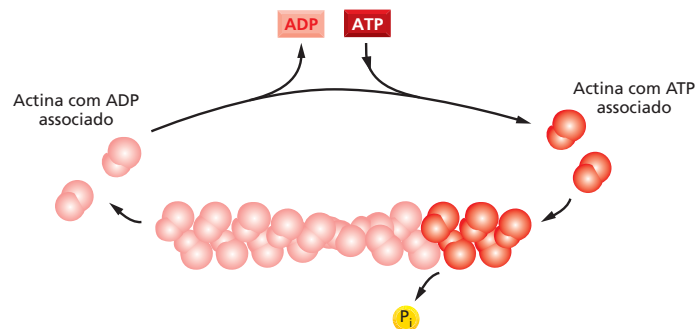



Figura 17-30 A hidrólise de ATP diminui a estabilidade do polímero de actina. Monômeros de actina no citosol carreiam ATP, o qual é hidrolisado em ADP logo após a sua inserção no filamento em crescimento. As moléculas de ADP ficam presas dentro do filamento de actina, incapazes de serem trocadas por ATP, a menos que o monômero que as carreia seja dissociado do filamento.

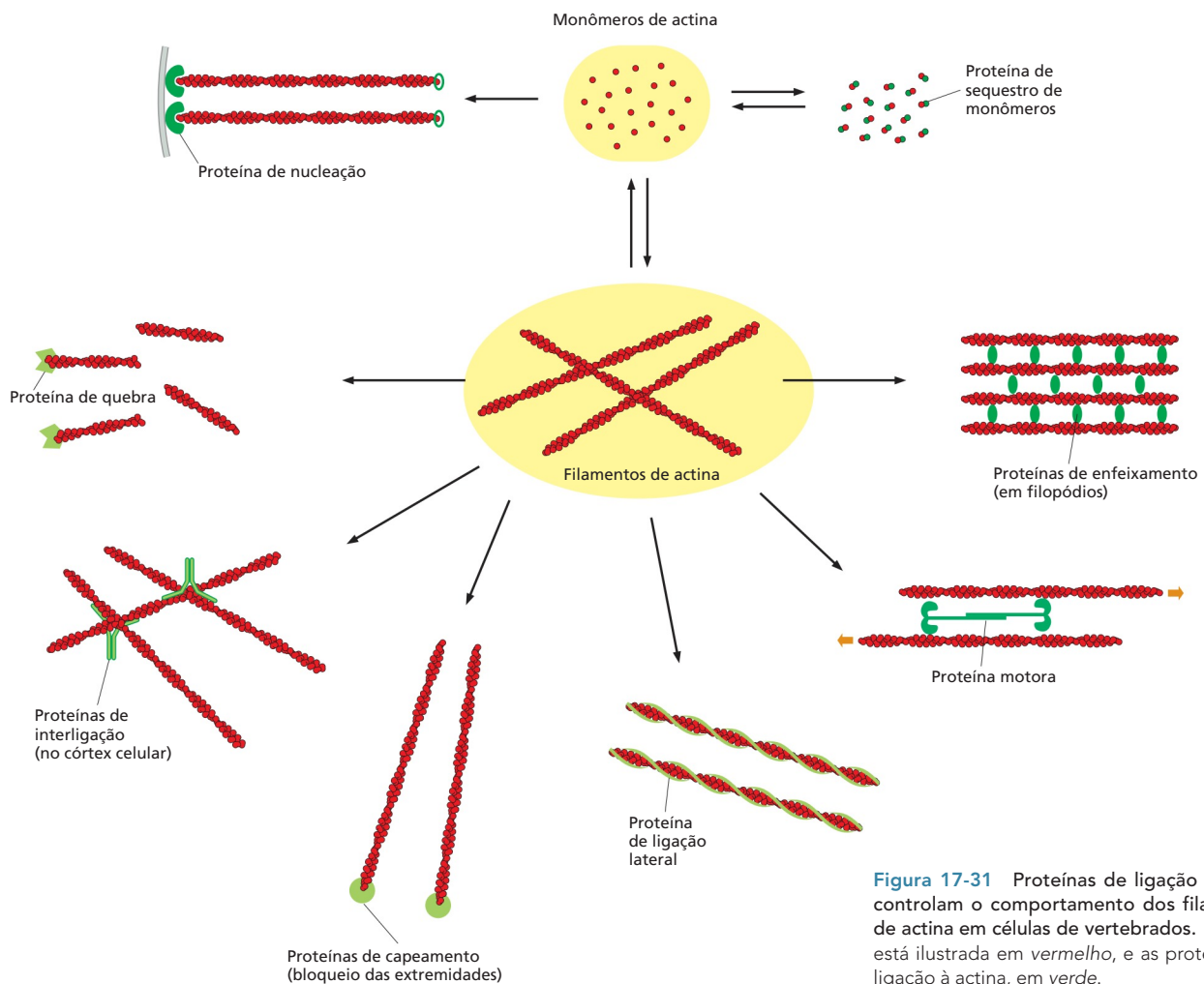



Figura 17-31 Proteínas de ligação à actina controlam o comportamento dos filamentos de actina em células de vertebrados. A actina está ilustrada em *vermelho*, e as proteínas de ligação à actina, em *verde*.

Diversas proteínas se ligam à actina e modificam suas propriedades

A actina corresponde a aproximadamente 5% da proteína total em uma célula animal típica; cerca de metade dessa actina está associada a filamentos, a outra metade permanece sob a forma de monômeros de actina no citosol. A concentração de monômeros é, consequentemente, alta – e muito maior do que a concentração necessária para que a polimerização de monômeros de actina purificados ocorra *in vitro*. O que, então, evita a completa polimerização dos monômeros de actina em filamentos nas células? A resposta é que as células contêm pequenas proteínas, como a *timosina* e a *profilina*, que se ligam aos monômeros de actina do citosol, impedindo que esses sejam adicionados às extremidades dos filamentos de actina. Essas proteínas desempenham um papel central na regulação da polimerização da actina pela manutenção desses monômeros de actina como reserva até o momento necessário. Quando há necessidade de filamentos de actina, outras proteínas de ligação à actina promovem a associação dos monômeros. Tanto as proteínas conhecidas como *forminas* quanto as *proteínas relacionadas à actina* (*ARPs*, de *actin-related proteins*) controlam a associação da actina e o avanço da borda anterior de uma célula em movimento.

Existe uma ampla gama de outras proteínas de ligação à actina nas células. A maioria dessas proteínas se liga a filamentos organizados de actina, em vez de se ligar aos monômeros de actina, e regula o comportamento de filamentos intactos (**Figura 17-31**). Proteínas de enfeixamento de actina, por exemplo, mantêm

unidos em feixes paralelos os filamentos de actina nas microvilosidades. Outras proteínas de interligação mantêm unidos os filamentos de actina sob a forma de uma trama semelhante a um gel dentro do *córtex celular* – a camada citoplasmática localizada exatamente abaixo da membrana plasmática. Proteínas de quebra de filamentos, como a *gelsolina*, fragmentam os filamentos de actina em pedaços mais curtos e, dessa forma, podem conferir um estado mais fluido ao gel de actina. Os filamentos de actina também podem estar associados a proteínas motoras para a formação de feixes contráteis, como ocorre nas células musculares, além de frequentemente formarem vias pelas quais as proteínas motoras transportam organelas, uma função especialmente conspícua em células vegetais.

No restante deste capítulo, abordaremos algumas estruturas características que os filamentos de actina podem formar e discutiremos como diferentes tipos de proteínas de ligação à actina estão envolvidos em sua formação. Iniciaremos pelo córtex celular, rico em actina, e seu papel na locomoção celular, e, na seção final, consideraremos o aparelho contrátil das células musculares como exemplo de uma estrutura estável com base em filamentos de actina.

Um córtex rico em actina reveste a membrana plasmática na maioria das células eucarióticas

Apesar de a actina ser encontrada em todo o citoplasma de uma célula eucariótica, na maioria das células ela se encontra concentrada em uma camada que existe exatamente abaixo da membrana plasmática. Nessa região, denominada **córtex celular**, filamentos de actina estão conectados por intermédio de proteínas de ligação à actina, formando uma trama que sustenta a superfície externa da célula, conferindo resistência mecânica a essa. Nos eritrócitos, como descrito no Capítulo 11, uma rede simples e regular de fibras proteicas conectada à membrana plasmática fornece o suporte necessário para a manutenção de seu formato discoide simples e característico (ver Figura 11-31). O córtex celular de outras células animais, no entanto, é mais espesso e complexo e sustenta um conjunto muito mais rico de formas e movimentos. Assim como no eritrócito, ele contém espectrina e anquirina, mas também inclui uma densa rede de filamentos de actina que se projetam rumo ao citoplasma, onde se interligam para a formação de uma trama tridimensional. Essa trama de actina cortical controla a morfologia e as propriedades mecânicas da membrana plasmática e da superfície celular. Como veremos, rearranjos dos filamentos de actina no córtex fornecem a base molecular para alterações morfológicas e motrizes das células.

A migração celular depende de actina

Diferentes células se movem deslizando sobre as superfícies, em vez de nadarem impulsionadas por cílios ou flagelos. Amebas carnívoras deslizam continuamente em busca de alimento. A região frontal de um axônio em desenvolvimento migra em resposta a fatores de crescimento, seguindo uma trilha de substâncias ligadas ao substrato ou de químicos solúveis, rumo ao seu alvo sináptico terminal. Os *neutrófilos* migram pelos tecidos quando "farejam" pequenas moléculas solúveis oriundas de bactérias. Os neutrófilos, seguindo essas moléculas, são capazes de encontrar as bactérias para destruí-las. Nesses caçadores do sistema imune, a ligação de moléculas quimiotáxicas aos receptores existentes na superfície celular induz alterações na organização dos filamentos de actina que direcionam as células rumo a suas presas.

Os mecanismos moleculares dessas e de outras formas de migração celular envolvem alterações coordenadas de diversas moléculas em diferentes regiões da célula, não sendo responsabilidade de uma única organela locomotora facilmente identificável, como acontece no caso de flagelos. Em termos gerais, no entanto, sabe-se que três processos inter-relacionados são essenciais: (1) a célula emite protrusões em sua região "frontal", ou borda anterior; (2) essas protrusões aderem à superfície sobre a qual a célula se locomove, e (3) a porção restante da célula é impulsionada para a frente pelo tracionamento nesses pontos de ancoramento (**Figura 17-32**).

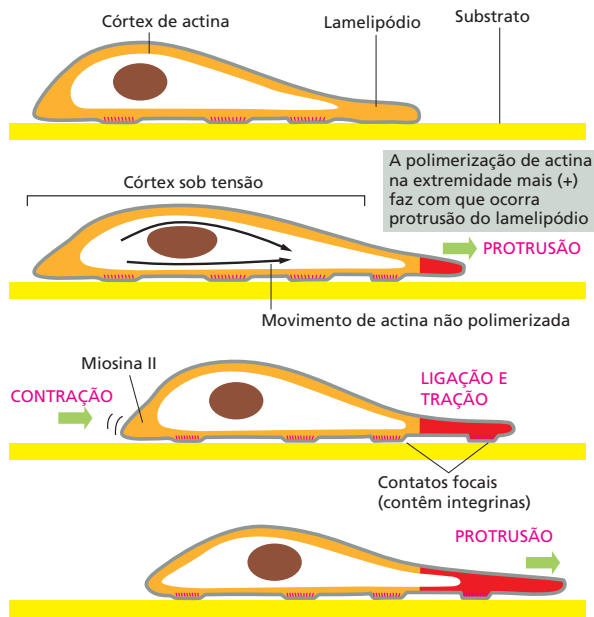



Figura 17-32 Forças geradas no córtex rico em actina impulsionam uma célula. Nesse modelo, proposto para o mecanismo de movimento celular, a polimerização de actina na borda anterior da célula *impulsiona* a membrana plasmática para a frente (protrusão) e forma novas regiões de córtex de actina, ilustradas aqui em *vermelho*. Novos pontos de ancoramento são estabelecidos entre os filamentos de actina e a superfície sobre a qual a célula está se arrastando (substrato). Uma contração na parte posterior impele o corpo da célula para a frente (tração). Conforme a célula avança, novos pontos de ancoramento são estabelecidos na região anterior, sendo dissociados os pontos de ancoramento antigos, na região posterior. Esse mesmo ciclo é repetido várias vezes, fazendo a célula avançar passo a passo.

Todos esses processos envolvem actina, mas sob diferentes formas. O primeiro passo, o crescimento da superfície celular para a frente, é dirigido pela polimerização de actina. A borda anterior de um fibroblasto em movimento, em uma cultura de células, estende constantemente finos **lamelipódios** laminares, os quais contêm uma densa rede de filamentos de actina, orientados de tal modo que a maioria dos filamentos apresenta suas extremidades mais próximo à membrana plasmática (Figura 17-33). Diversas células também desenvolvem protrusões finas e rígidas denominadas **filopódios**, tanto na região da borda anterior quanto ao longo de toda sua superfície. Essas estruturas apresentam aproximadamente 0,1 μm de largura e 5-10 μm de comprimento, contendo um feixe frouxo de 10-20 filamentos de actina, também orientados com suas extre-

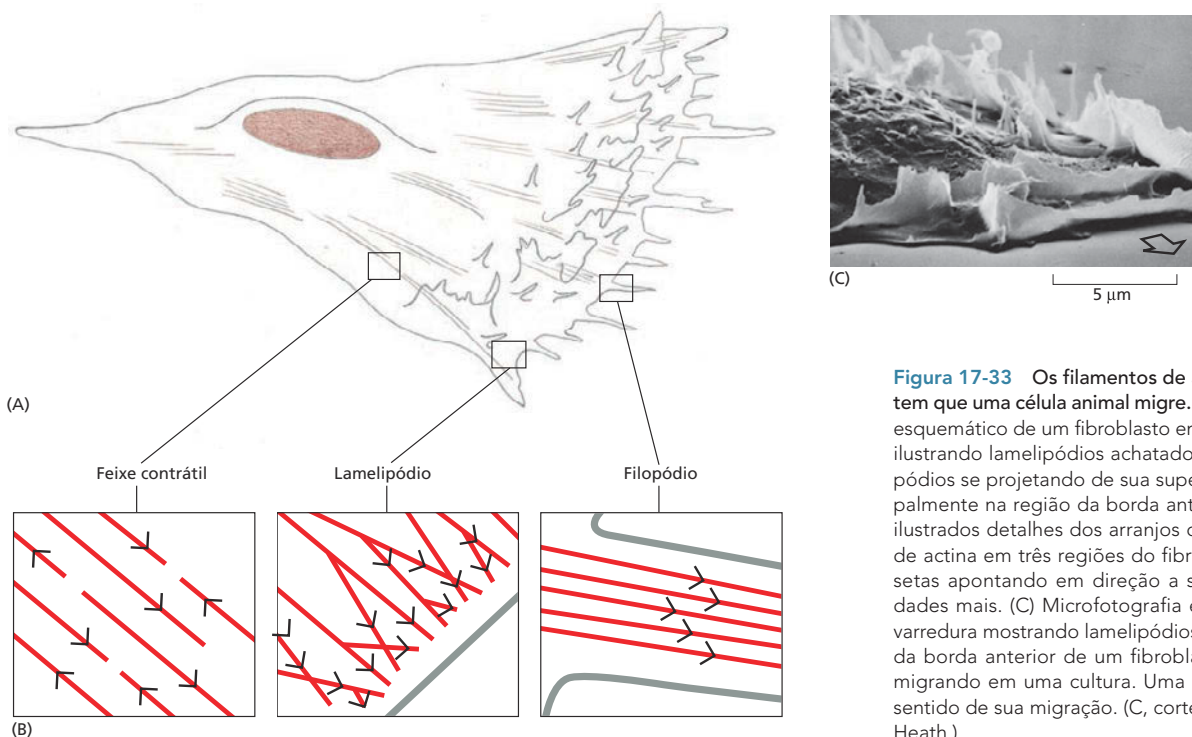



Figura 17-33 Os filamentos de actina permitem que uma célula animal migre. (A) Desenho esquemático de um fibroblasto em movimento ilustrando lamelipódios achatados e finos filopódios se projetando de sua superfície, principalmente na região da borda anterior. (B) São ilustrados detalhes dos arranjos de filamentos de actina em três regiões do fibroblasto, com setas apontando em direção a suas extremidades mais. (C) Microfotografia eletrônica de varredura mostrando lamelipódios e filopódios da borda anterior de um fibroblasto humano migrando em uma cultura. Uma seta indica o sentido de sua migração. (C, cortesia de Julian Heath.)

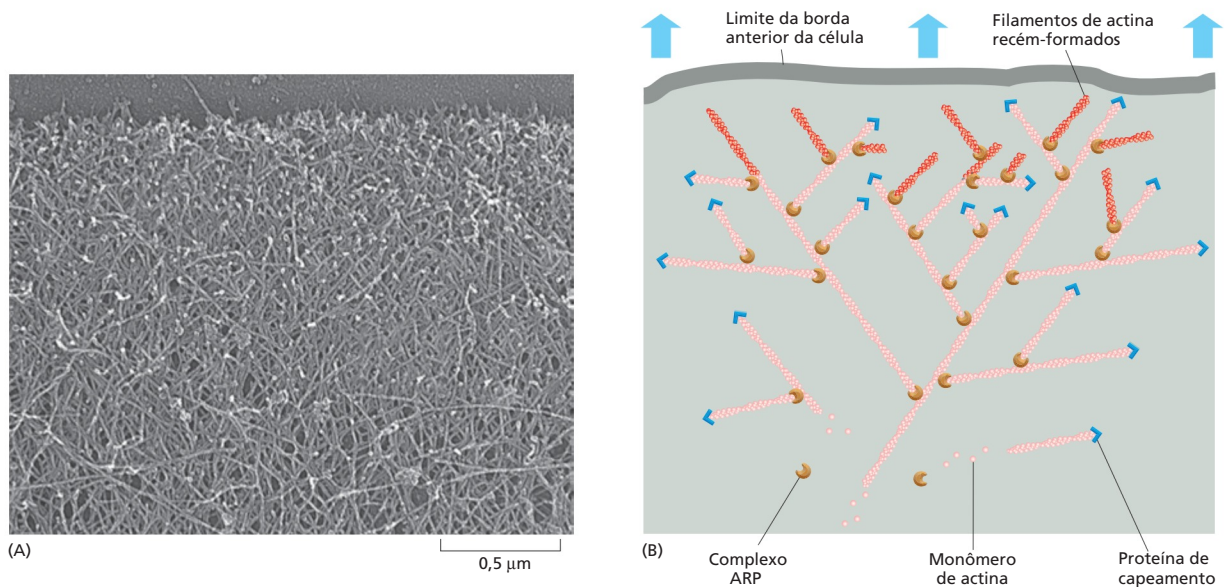
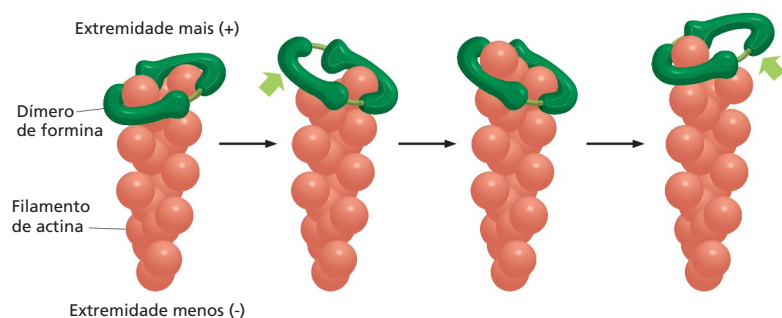



Figura 17-34 Uma rede de filamentos de actina impulsiona a borda anterior em um lamelipódio. (A) Queratinócitos de alta motilidade provenientes da pele de sapos foram fixados, secos, corados com platina e examinados sob microscopia eletrônica. Filamentos de actina formam uma densa rede contendo filamentos com extremidades de rápido crescimento que terminam na margem anterior do lamelipódio (parte superior da figura). (B) A nucleação de novos filamentos de actina (*vermelho*) é mediada por complexos ARP (*laranja*) ligados lateralmente a filamentos preexistentes. As estruturas ramificadas resultantes impulsionam a membrana plasmática para a frente. As extremidades mais dos filamentos de actina tornam-se protegidas por proteínas de capeamento (*azul*), e as extremidades menos dos filamentos de actina, próximas ao centro da célula, sofrem dissociação contínua por meio da ação de proteínas de despolimerização (não mostradas). Assim, a rede de actina, como um todo, apresenta um movimento contínuo para a frente, mediado pela associação de filamentos na região anterior e pela dissociação na região posterior. (A, cortesia de Tatyana Svitkina e Gary Borisy.)

midades mais rumo ao exterior. A região da célula que está avançando (o cone de crescimento) de um axônio neuronal em desenvolvimento estende filopódios ainda mais longos, que alcançam até 50 µm, os quais as auxiliam a sondar o ambiente e a encontrar o caminho correto que a levará ao seu alvo. Tanto os lamelipódios quanto os filopódios são estruturas móveis e exploratórias que são formadas e retraídas a grandes velocidades, movendo-se a aproximadamente 1 µm por segundo. Acredita-se que ambas as estruturas se originem via um crescimento local rápido de filamentos de actina, os quais são nucleados na membrana plasmática e são estendidos pela adição de monômeros de actina em suas extremidades mais (+). Dessa forma, os filamentos empurram a membrana para a frente sem rasgá-la.

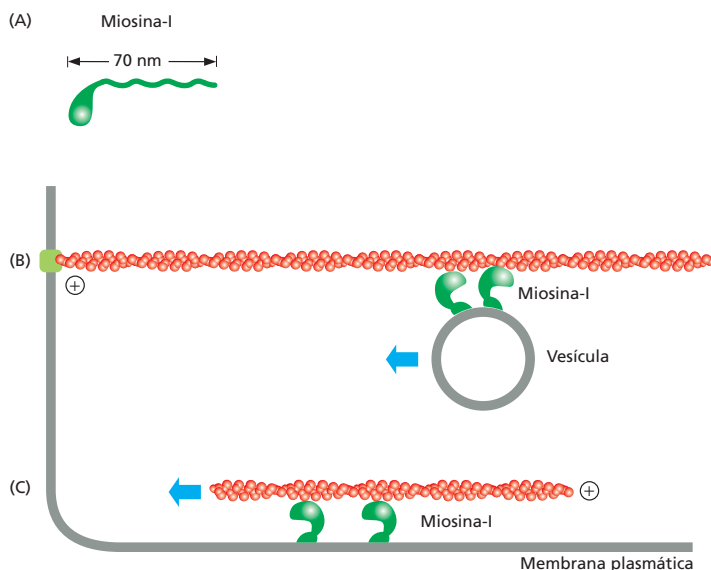
A formação e o crescimento de filamentos de actina na borda anterior de uma célula são auxiliados por diferentes proteínas acessórias de ligação à actina. Um conjunto dessas proteínas – as proteínas relacionadas à actina, ou ARPs – promove a formação de uma rede filamentos de actina ramificados no lamelipódio. Essas proteínas formam complexos que se ligam a filamentos preexistentes de actina e promovem a nucleação e formação de novos filamentos, os quais crescerão em ângulo formando um braço lateral (**Figura 17-34**). Com o auxílio de proteínas de ligação à actina adicionais, essa rede apresenta uma associação contínua na borda anterior e dissociação na região posterior, impulsionando os lamelipódios para a frente. O outro tipo de protrusão, o filopódio, é dependente das forminas, que se ligam às extremidades em crescimento dos filamentos de actina e promovem a adição de novos monômeros para a formação de filamentos retos não ramificados (**Figura 17-35**). As forminas são também utilizadas em outros pontos para a montagem de filamentos não ramificados, como no sulco de clivagem de uma célula animal em divisão.

Figura 17-35 As forminas auxiliam a elongação dos filamentos de actina. Dímeros de formina (*verde*) se ligam à extremidade em crescimento de um filamento de actina (*vermelho*). Cada subunidade de formina se liga a um monômero de actina. O dímero de formina promove o crescimento do filamento pela estabilização de uma das duas subunidades de actina expostas na extremidade mais (+) e inserção de um novo monômero de actina.

Quando os lamelipódios e os filopódios fazem contato com uma região favorável sobre a superfície, eles aderem: proteínas transmembrana em suas membranas plasmáticas, denominadas *integrinas*, aderem a moléculas da matriz extracelular que circunda as células ou a moléculas presentes na superfície de outra célula sobre a qual a célula em migração está se movendo. Simultaneamente, na face intracelular da membrana da célula em movimento, as integrinas capturam filamentos de actina, criando, dessa forma, um ponto de ancoramento robusto para o sistema de filamentos de actina existente dentro da célula em locomoção (ver Figura 20-14C). Para utilizar essa âncora com o objetivo de alavancar seu corpo para a frente, a célula deverá então fazer uso de contrações internas que exercerão uma força de impulsão (ver Figura 17-32). Isso também é dependente de actina, mas de um outro modo – via interação dos filamentos de actina com proteínas motoras conhecidas como *miosinas*.

Ainda não está estabelecido como essa força de impulsão é produzida: podem ser responsáveis tanto a contração de feixes de filamentos de actina no citoplasma quanto a contração da rede de actina no córtex celular, ou mesmo ambas. No entanto, os princípios gerais de como as proteínas motoras do tipo miosina interagem com os filamentos de actina para gerar o movimento estão bem claros, como será apresentado a seguir.

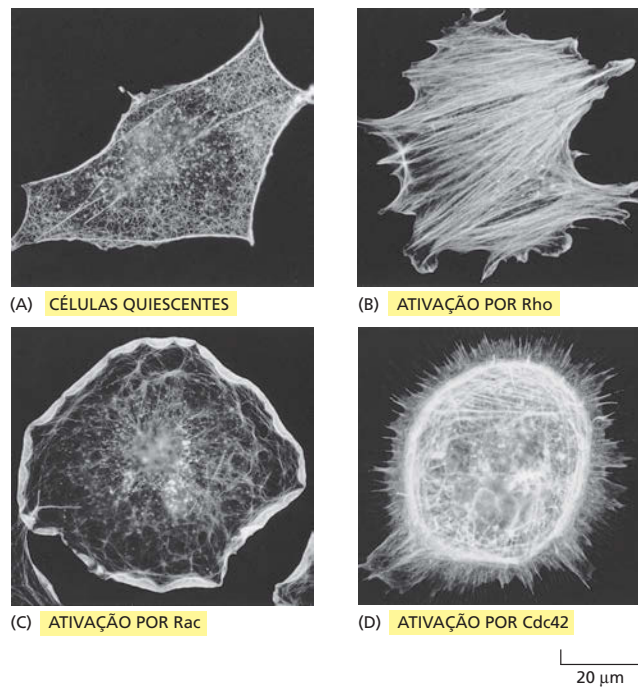
A actina se associa à miosina para a formação de estruturas contráteis

Todas as proteínas motoras dependentes de actina pertencem à família da **miosina**. Elas se ligam ao ATP, hidrolisando-o, o que fornece energia para seu movimento ao longo dos filamentos de actina, no sentido da extremidade menos (-) do filamento em direção à extremidade mais (+). A miosina, assim como a actina, foi inicialmente identificada em músculo esquelético, e muitas das informações a respeito das interações que ocorrem entre essas duas proteínas provêm de estudos em células musculares. Existem vários tipos diferentes de miosina nas células, sendo as subfamílias da *miosina-I* e da *miosina-II* as mais abundantes. A miosina-II é a principal miosina encontrada em células musculares. A miosina-I é encontrada em todos os tipos de células, e como é a mais simples no que diz respeito à estrutura e ao mecanismo de ação, será a primeira a ser apresentada.

As moléculas de miosina-I possuem apenas um domínio de cabeça e uma cauda (**Figura 17-36A**). O domínio da cabeça interage com os filamentos de actina e possui atividade motora de hidrólise de ATP que permite seu movimento ao longo do filamento por meio de ciclos de ligação, de liberação e de religação (**Animação 17.9**).

QUESTÃO 17-6

Suponha que as moléculas de actina em uma célula de epiderme em cultura tenham sido aleatoriamente marcadas de tal modo que 1 em cada 10.000 moléculas carreia um marcador fluorescente. O que você esperaria ver se examinasse o lamelipódio (borda anterior) dessa célula pela microscopia de fluorescência? Assuma que seu microscópio apresenta sensibilidade suficiente para a detecção de até mesmo uma única molécula fluorescente.

Figura 17-36 A pequena cauda de uma molécula de miosina-I contém sítios que se ligam a vários componentes da célula, inclusive a membranas. (A) A miosina-I possui uma única cabeça globular e uma cauda que se associa a outras moléculas ou organelas da célula. Essa organização permite que o domínio da cabeça movimente uma vesícula em relação a um filamento de actina (B), ou um filamento de actina e a membrana plasmática, uma em relação à outra (C). Observe que o grupo da cabeça da miosina sempre se movimenta em direção à extremidade mais (+) do filamento de actina ao qual ele está conectado.

Figura 17-37 A ativação de proteínas de ligação a GTP apresenta drásticos efeitos na organização de filamentos de actina em fibroblastos. Nestas microfotografias, a actina foi marcada com faloidina fluorescente, uma molécula que se liga a filamentos de actina (ver Tabela 17-1, p. 582). (A) Fibroblastos não estimulados apresentam filamentos de actina predominantemente no córtex. (B) A microinjeção de uma forma ativada de Rho provoca a rápida montagem de longos feixes contráteis não ramificados. (C) A microinjeção de uma forma ativada da proteína Rac, uma proteína de ligação a GTP semelhante a Rho, provoca a formação de um enorme lamelipódio que se estende por toda a circunferência da célula. (D) A microinjeção de uma forma ativada de Cdc42, outro membro da família Rho, estimula a protrusão de diversos filopódios longos na periferia da célula. (De A. Hall, *Science* 279:509-514, 1998. Com permissão de AAAS.)

A cauda varia entre os diferentes tipos de miosina-I e determina quais componentes celulares serão transportados pela proteína motora. Por exemplo, a cauda pode ligar-se a um tipo determinado de vesícula membranar e impulsioná-la através da célula ao longo das vias de filamentos de actina (Figura 17-36B), ou pode ligar-se à membrana plasmática e movê-la em relação aos filamentos de actina corticais, fazendo com que a membrana adquira uma nova forma (Figura 17-36C).

Os sinais extracelulares controlam a organização dos filamentos de actina

Vimos que a miosina e outras proteínas de ligação à actina podem regular o posicionamento, a organização e o comportamento dos filamentos de actina. No entanto, a atividade dessas proteínas acessórias é, por sua vez, controlada por sinais extracelulares, permitindo que a célula reorganize seu citoesqueleto em resposta ao ambiente.

No caso do citoesqueleto de actina, tais rearranjos estruturais são induzidos pela ativação de uma ampla variedade de proteínas receptoras inseridas na membrana plasmática. A seguir, todos esses sinais parecem convergir, no interior da célula, rumo a um grupo de proteínas de ligação ao GTP intimamente relacionadas e denominadas **família da proteína Rho**. Como vimos no Capítulo 16, proteínas desse tipo se comportam como comutadores moleculares que controlam processos celulares intercalando entre um estado ativo, ligado ao GTP, e um estado inativo, ligado ao GDP (ver Figura 16-14B). No caso do citoesqueleto, a ativação de diferentes membros da família Rho afeta a organização dos filamentos de actina de diversas formas. Por exemplo, a ativação de um membro da família Rho induz a polimerização de actina e seu enfeixamento para a formação de filopódios; a ativação de outro membro promove a formação de lamelipódios laminares e de ondulações sobre a membrana, e a ativação do próprio Rho induz a produção de feixes de filamentos de actina com miosina II e o agrupamento de integrinas que promovem a migração celular (Figura 17-37).

Essas alterações estruturais complexas e dramáticas ocorrem porque as proteínas de ligação ao GTP, em conjunto a proteína-cinases e proteínas acessórias que interagem com elas, atuam como uma rede de computadores para controlar a organização e a dinâmica da actina. Essa rede recebe sinais externos

QUESTÃO 17-7

Na borda anterior de uma célula em migração, as extremidades mais dos filamentos de actina estão posicionadas próximo à membrana plasmática, e os monômeros de actina são adicionados a essas extremidades e empurram a membrana para fora, formando os lamelipódios e os filopódios. O que você acha que segura os filamentos, mantendo as extremidades opostas à de adição de monômeros, e evita que esses sejam empurrados para o interior da célula?

a partir de nutrientes, fatores de crescimento e pelo contato com as células vizinhas, além de "informações internas" relacionadas ao estado nutricional da célula, ao tamanho e à potencialidade para divisão. A rede Rho processa essas entradas e produz sinais que modelam o citoesqueleto de actina – por exemplo, pela ativação de proteínas formina que promovem a formação de filopódios (ver Figura 17-35) ou pelo aumento na atividade de nucleação de actina mediada pelos complexos ARP na borda anterior da célula para gerar grandes lamelipódios.

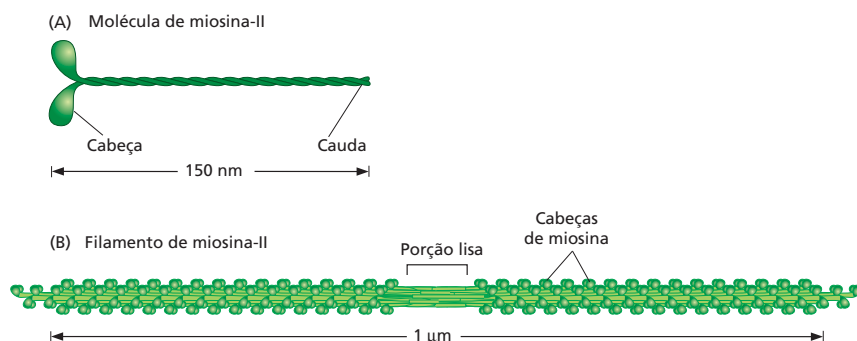
Um dos rearranjos de elementos citoesqueléticos mais fortemente regulados ocorre quando a actina se associa à miosina nas fibras musculares em resposta à sinalização do sistema nervoso. Discutiremos a seguir como essa interação molecular pode gerar os movimentos de força repetitivos e rápidos, característicos da contração dos músculos de vertebrados.

CONTRAÇÃO MUSCULAR

A contração muscular é o mais familiar e mais bem compreendido dos movimentos de células animais. Em vertebrados, correr, caminhar, nadar ou voar são atividades que dependem da capacidade da *musculatura esquelética* em contrair-se fortemente e movimentar os diversos ossos. Movimentos involuntários, como os batimentos cardíacos ou o peristaltismo do intestino, dependem da *musculatura cardíaca* e da *musculatura lisa*, respectivamente, as quais são formadas a partir de células musculares que diferem em relação à estrutura quando comparadas à musculatura esquelética, mas que também utilizam a actina e a miosina em mecanismos similares de contração. Apesar de as células musculares serem altamente especializadas, diversos movimentos celulares – da locomoção de células como um todo até a movimentação de componentes no interior das células – dependem de interações entre a actina e a miosina. Grande parte de nosso conhecimento referente aos mecanismos do movimento celular é proveniente de estudos sobre a contração de células musculares. Nesta seção, revisaremos como a actina e a miosina interagem visando à criação de movimento coordenado.

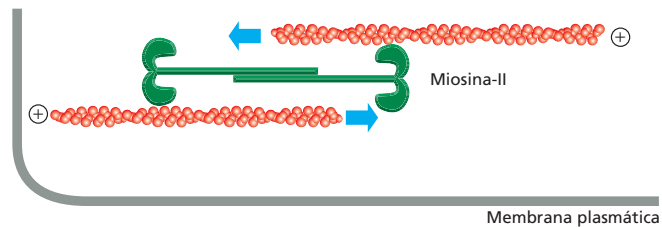
A contração muscular se baseia em feixes de actina e miosina

A miosina muscular pertence à subfamília das miosinas denominada miosina-II, na qual todos os membros apresentam duas cabeças ATPase e uma longa cauda em bastão (**Figura 17-38A**). Cada molécula de miosina-II é um dímero composto por um par de moléculas de miosina idênticas, mantidas unidas pelas suas caudas; a molécula possui duas cabeças ATPase globulares em uma das extremidades e uma única cauda supertorcida na outra. Agrupamentos de moléculas de miosina-II são formados pela interação de suas caudas supertorcidas, formando um *filamento de miosina* bipolar, no qual as cabeças se projetam para as laterais do complexo (Figura 17-38B).

O filamento de miosina é como uma flecha com duas pontas, onde os dois conjuntos de cabeças estão posicionados em sentidos opostos, a partir do centro da flecha. Um conjunto de cabeças se liga a filamentos de actina sob uma dada orientação, movendo-os nessa direção; o outro conjunto de cabeças se liga a

QUESTÃO 17-8

Se tanto os filamentos espessos quanto filamentos delgados do músculo são constituídos a partir de subunidades unidas entre elas por ligações não covalentes fracas, como é possível que um ser humano seja capaz de erguer objetos pesados?

Figura 17-38 Moléculas de miosina-II podem associar-se umas com as outras para a formação de filamentos de miosina. (A) A molécula de miosina-II tem duas cabeças globulares e uma cauda supertorcida. (B) As caudas da miosina-II se associam mutuamente para formar um filamento de miosina bipolar no qual as cabeças se projetam para fora, em direções opostas, a partir do centro. A porção lisa na região central dos filamentos é composta unicamente por caudas.

Figura 17-39 Pequenos filamentos bipolares compostos por moléculas de miosina-II podem provocar o deslizamento de filamentos de actina, mediando, desse modo, o *encurtamento* local de um feixe de filamentos de actina. Da mesma forma que ocorre com a miosina-I, o grupo de cabeça da miosina-II se movimenta rumo à extremidade mais (+) do filamento de actina ao qual ele está conectado.

outros filamentos de actina, em orientação oposta, movendo-os rumo a essa direção oposta (Figura 17-39). O efeito resultante consiste no deslizamento dos conjuntos de filamentos de actina opostamente orientados, um sobre o outro. Podemos então compreender como os filamentos de actina e os filamentos de miosina, conjuntamente organizados em um feixe, fazem com que esse feixe seja capaz de gerar uma força de contração. Esse fenômeno é mais nitidamente observado na contração muscular; no entanto, ele também ocorre nos *feixes contráteis* de filamentos de actina e nos filamentos de miosina II (ver Figura 17-28B) que se associam transientemente em células não musculares e no *anel contrátil*, que faz com que uma célula se divida em duas, contraindo e puxando a membrana plasmática para o interior (discutido no Capítulo 19).

Os filamentos de actina deslizam contra os filamentos de miosina durante a contração muscular

As longas fibras do músculo esquelético consistem em grandes células individuais formadas pela fusão de várias células menores. Os núcleos individuais das células que contribuíram para sua formação permanecem retidos na fibra muscular e se posicionam exatamente abaixo da membrana plasmática. A maior parte do citoplasma é composto de **miofibrilas**, os elementos contráteis da célula muscular. Essas estruturas cilíndricas possuem um diâmetro de 1-2 μm e podem ser tão longas quanto a própria célula muscular (Figura 17-40A).

Uma miofibrila consiste em uma cadeia de unidades contráteis idênticas, ou **sarcômeros**. Cada sarcômero possui aproximadamente 2,5 μm de comprimento, e o padrão relativo à repetição de sarcômeros dá à miofibrila de vertebrados sua aparência estriada ou listrada (Figura 17-40B). Os sarcômeros são conjuntos altamente organizados de dois tipos de filamentos – filamentos de actina e filamentos de miosina-II específica de músculo. Os filamentos de miosina (*filamentos espessos*) se posicionam na região central do sarcômero, ao passo que os filamentos de actina, mais finos (*filamentos delgados*), estendem-se para o interior a partir de cada uma das extremidades do sarcômero (onde estão an-

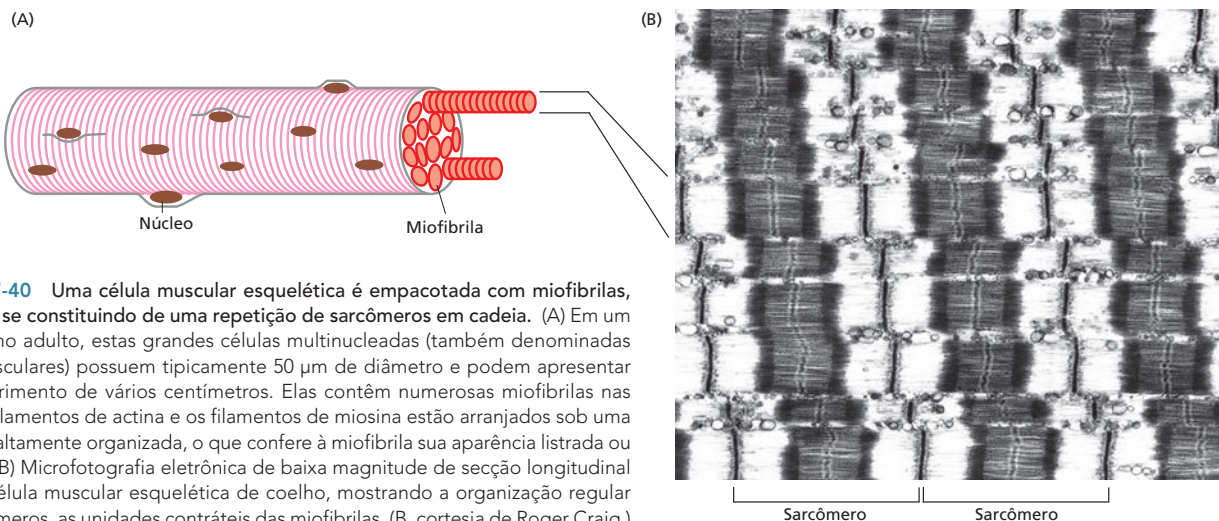
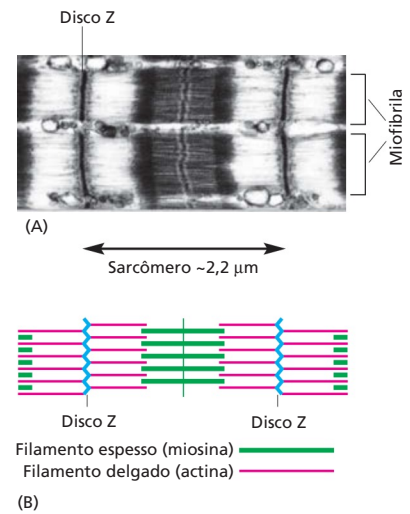



Figura 17-40 Uma célula muscular esquelética é empacotada com miofibrilas, cada qual se constituindo de uma repetição de sarcômeros em cadeia. (A) Em um ser humano adulto, estas grandes células multinucleadas (também denominadas fibras musculares) possuem tipicamente 50 μm de diâmetro e podem apresentar um comprimento de vários centímetros. Elas contêm numerosas miofibrilas nas quais os filamentos de actina e os filamentos de miosina estão arranjados sob uma estrutura altamente organizada, o que confere à miofibrila sua aparência listrada ou estriada. (B) Microfotografia eletrônica de baixa magnitude de secção longitudinal de uma célula muscular esquelética de coelho, mostrando a organização regular dos sarcômeros, as unidades contráteis das miofibrilas. (B, cortesia de Roger Craig.)

Figura 17-41 **Os sarcômeros são as unidades contráteis do músculo.** (A) Detalhe da célula muscular esquelética mostrada na Figura 17-40 mostrando duas miofibrilas e a indicação da extensão de um sarcômero. (B) Diagrama esquemático de um sarcômero isolado mostrando a origem das bandas claras e escuras vistas em microscopia. Os discos Z, em ambas as extremidades de cada sarcômero, são pontos de ligação para os filamentos de actina; os filamentos mais espessos localizados na região central (*verde*) são compostos, cada um, de várias moléculas de miosina-II. (A, cortesia de Roger Craig.)

corados pelas suas extremidades mais (+) a uma estrutura denominada *disco Z*) e se sobrepõem às extremidades dos filamentos de miosina (**Figura 17-41**).

A contração de uma célula muscular é provocada pelo encurtamento simultâneo de todos os sarcômeros, o que, por sua vez, é causado pelo deslizamento dos filamentos de actina sobre os filamentos de miosina, sem que ocorra alteração no comprimento de qualquer um dos tipos de filamentos (**Figura 17-42**). O movimento de deslizamento é gerado pelas cabeças da miosina que se projetam lateralmente a partir do filamento de miosina e interagem com os filamentos adjacentes de actina. Quando um músculo é estimulado para a contração, as cabeças de miosina começam uma caminhada ao longo do filamento de actina por meio de ciclos repetidos de ligação e liberação. Ao longo de cada ciclo, a cabeça de miosina se liga a uma molécula de ATP, hidrolisando-a. Isso provoca uma série de alterações conformacionais na molécula de miosina, fazendo com que essa mova a extremidade de sua cabeça aproximadamente 5 nm ao longo do filamento de actina, em direção à extremidade mais (+). Esse movimento, repetido a cada ciclo de hidrólise de ATP, impulsiona a molécula de miosina unilateralmente sobre o filamento de actina (**Figura 17-43**). Assim, as cabeças de miosina tensionam o filamento de actina, fazendo com que esse deslize ao longo do filamento de miosina. A ação conjunta de muitas cabeças de miosina tensionando os filamentos de actina e de miosina uns contra os outros leva à contração do sarcômero. Após a completa contração, as cabeças de miosina perdem contato completamente com o filamento de actina, e o músculo sofre relaxamento.

Cada filamento de miosina possui aproximadamente 300 cabeças de miosina. Cada cabeça de miosina pode ligar-se e desconectar-se da actina aproximadamente cinco vezes por segundo, permitindo que os filamentos de actina e de

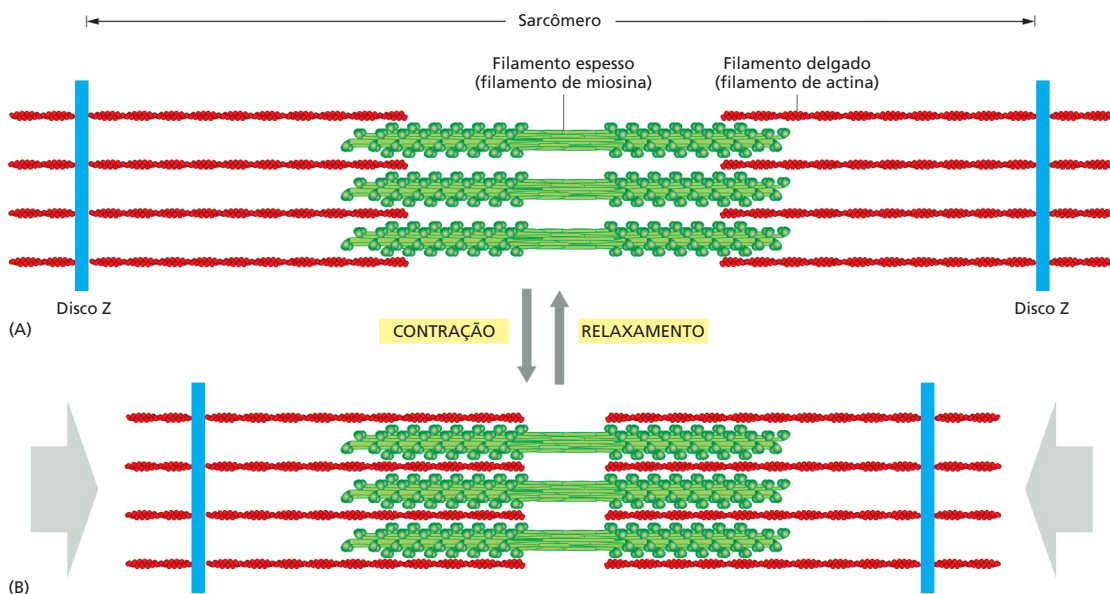



Figura 17-42 **Os músculos se contraem por um mecanismo de deslizamento de filamentos.** (A) Os filamentos de miosina e actina de um sarcômero se sobrepõem com a mesma polaridade relativa em ambos os lados de uma linha mediana. Lembre-se de que os filamentos de actina estão ancorados por suas extremidades mais (+) ao disco Z, e que os filamentos de miosina são bipolares. (B) Durante a contração, os filamentos de actina e miosina deslizam uns sobre os outros sem que eles próprios sofram encurtamento. O movimento de deslizamento é conduzido pela caminhada das cabeças de miosina rumo à extremidade mais (+) do filamento de actina adjacente (**Animação 17.8**).

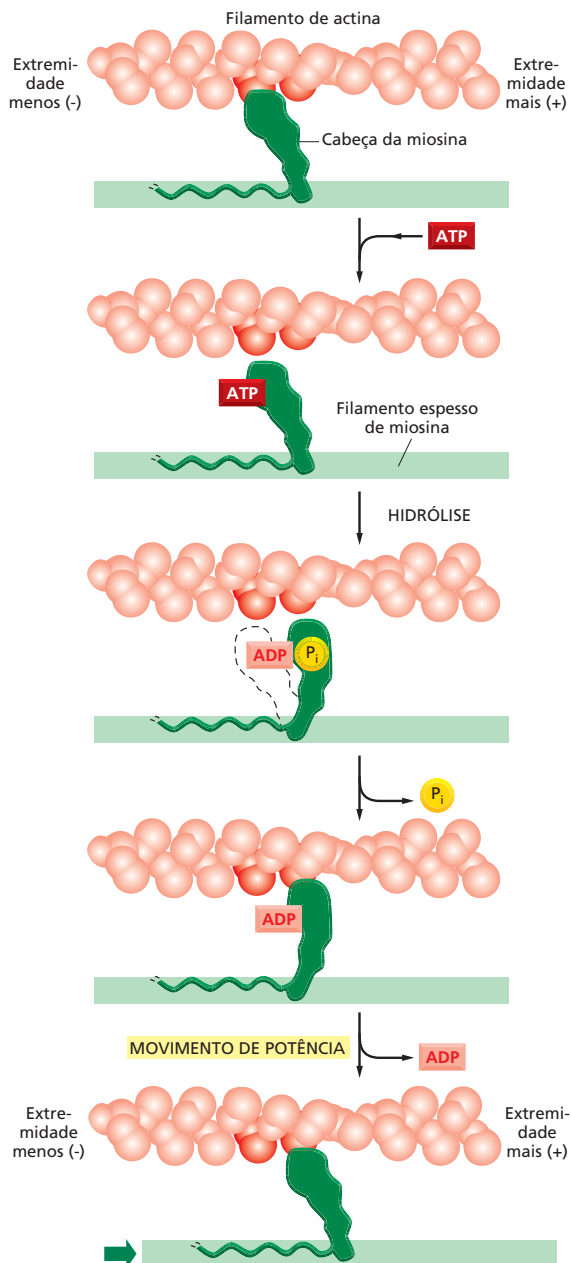



Figura 17-43 Uma molécula de miosina se desloca ao longo de um filamento de actina por meio de ciclos de alterações estruturais. Para ver a actina e a miosina em ação, assista à **Animação 17.10** (Com base em I. Rayment *et al.*, *Science* 261:50-58, 1993. Com permissão de AAAS.)

miosina sofram um deslizamento a uma velocidade de até 15 µm por segundo. Essa velocidade é suficiente para levar um sarcômero de um estado de total extensão (3 µm) a um estado de contração total (2 µm) em menos de um décimo de segundo. Todos os sarcômeros de um músculo se encontram acoplados entre si e são induzidos quase que simultaneamente pelo sistema de sinalização descrito na próxima seção. Desse modo, um músculo inteiro se contrai extremamente rápido, em geral, em um intervalo de um décimo de segundo.

A contração muscular é induzida por um aumento súbito de Ca^{2+}

A interação molecular geradora de força que ocorre entre os filamentos de actina e miosina apenas é desencadeada quando a musculatura esquelética recebe um sinal proveniente do sistema nervoso. O sinal derivado de uma terminação nervosa induz um potencial de ação (discutido no Capítulo 12) na membrana

Figura 17-44 **Túbulos T e retículo sarcoplasmático envolvem as miofibrilas.** (A) Representação dos dois sistemas de membrana que transmitem o sinal de contração da membrana plasmática da célula muscular para todas as miofibrilas da célula. (B) Microfotografia eletrônica mostrando uma secção em corte de dois túbulos T e dos compartimentos do retículo sarcoplasmático adjacente. (B, cortesia de Clara Franzini-Armstrong.)

plasmática da célula muscular. Essa excitação elétrica se espalha em questão de milissegundos por uma série de tubos membranares, denominados *túbulos transversos* (ou *túbulos T*), que se estendem para a região mais interna, a partir da membrana plasmática, em torno de cada miofibrila. A seguir, o sinal elétrico é enviado para o *retículo sarcoplasmático* – uma camada adjacente de vesículas achatadas e interconectadas que envolvem cada miofibrila como se fossem uma grande meia tipo arrastão (**Figura 17-44**).

O retículo sarcoplasmático é uma região especializada do retículo endoplasmático nas células musculares. Ele contém uma concentração extremamente alta de Ca^{2+}, e, em resposta à excitação elétrica recebida, uma quantidade desse Ca^{2+} é liberada no interior do citosol pelos canais iônicos que se abrem na membrana do retículo sarcoplasmático em virtude da alteração de voltagem na membrana plasmática (**Figura 17-45**). Como discutido no Capítulo 16, o Ca^{2+} é amplamente utilizado como sinalizador intracelular para a transmissão de mensagens externas para a maquinaria interna da célula. No caso do músculo, o Ca^{2+} interage com um comutador molecular composto por proteínas acessórias especializadas intimamente associadas aos filamentos de actina (**Figura 17-46A**). Uma dessas proteínas, a *tropomiosina*, é uma molécula rígida, em forma de bastão, que se liga à fenda da hélice da actina, sobrepondo-se a sete monômeros de actina e evitando que as cabeças da miosina se associem ao filamento de actina. Outra, a *troponina*, é um complexo proteico que inclui uma proteína sensível a Ca^{2+} que está associada à extremidade de uma molécula de tropomiosina. Quando os níveis de Ca^{2+} se elevam no citosol, o Ca^{2+} se liga à troponina, induzindo uma alteração conformacional. Essa alteração, por sua vez, faz com que a molécula de tropo-

QUESTÃO 17-9

Compare a estrutura de filamentos intermediários com a de filamentos de miosina-II das células musculares esqueléticas. Quais são suas principais similaridades? Quais são suas principais diferenças? Como essas diferenças estruturais se relacionam às suas funções?

Figura 17-45 **Na musculatura esquelética, a contração envolve sinalização por Ca^{2+}.** Esse diagrama esquemático ilustra como se acredita que um canal de liberação de Ca^{2+} na membrana do retículo sarcoplasmático seja aberto pela ativação de um canal de Ca^{2+} controlado por voltagem presente na membrana do túbulo T.

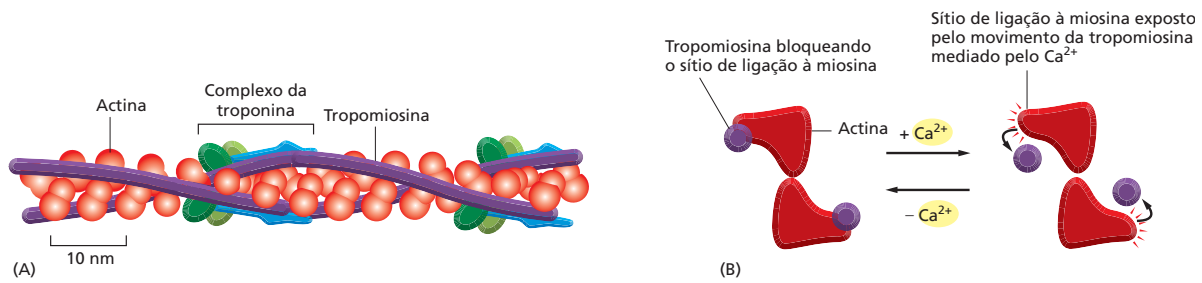



Figura 17-46 A contração muscular esquelética é controlada pela troponina. (A) Um filamento delgado de uma célula muscular mostrando as posições da tropomiosina e da troponina sobre o filamento de actina. Cada molécula de tropomiosina possui sete regiões de sequência homóloga regularmente espaçadas, tendo sido sugerido que cada uma possua capacidade de ligar-se a uma subunidade de actina sobre o filamento. (B) Quando o Ca^{2+} se liga à troponina, essa move a tropomiosina, a qual anteriormente bloqueava a interação da actina com as cabeças da miosina. Nesse diagrama, o filamento delgado está ilustrado com extremidade ligada.

miosina altere ligeiramente sua posição, permitindo que as cabeças da miosina se liguem ao filamento de actina e deem início à contração (Figura 17-46B).

Visto que o sinal proveniente da membrana plasmática é transmitido em milissegundos (via túbulos tranversais e retículo sarcoplasmático) para cada sarcômero da célula, todas as miofibrilas de uma célula sofrerão contração simultaneamente. O aumento de Ca^{2+} no citosol cessa assim que o sinal nervoso é interrompido em virtude do fato de o Ca^{2+} ser rapidamente bombeado de volta ao retículo sarcoplasmático por intermédio de uma grande quantidade de bombas de Ca^{2+} existentes em sua membrana (discutido no Capítulo 12). Assim que as concentrações de Ca^{2+} tenham retornado a seus níveis de repouso, as moléculas de troponina e de tropomiosina retornam às suas posições originais, nas quais bloqueiam a ligação da miosina e consequentemente encerram a contração.

As células musculares desempenham funções bastante especializadas no organismo

A maquinaria contrátil altamente especializada das células musculares provavelmente evoluiu a partir de feixes contráteis de filamentos de actina e miosina, bem mais simples, encontrados em todas as células eucarióticas. A miosina-II de células não musculares é também ativada por uma elevação dos níveis de Ca^{2+} citosólico, apesar de o mecanismo de ativação ser bastante diferente. Um aumento de Ca^{2+} leva à fosforilação da miosina-II, o que altera a conformação dessa e permite sua interação com actina. Um mecanismo semelhante de ativação opera na *musculatura lisa*, que existe nas paredes do estômago, do intestino, do útero, das artérias e em diversas outras estruturas nas quais contrações lentas e constantes são necessárias. As contrações produzidas por esse segundo sistema são mais lentas, pois é necessário um certo tempo para que moléculas enzimáticas se difundam para as cabeças de miosina e realizem a fosforilação ou a desfosforilação. No entanto, esse mecanismo apresenta a vantagem de ser menos especializado e poder ser induzido por uma ampla gama de diferentes sinais: a contração da musculatura lisa, por exemplo, é induzida pela adrenalina, pela serotonina, por prostaglandinas e por uma série de outros sinais extracelulares.

Além das musculaturas esquelética e lisa, existem outras formas de musculatura, cada uma desempenhando uma função mecânica específica no organismo. Talvez a mais familiar de todas seja a do coração, ou *cardíaca*, a musculatura que dirige a circulação sanguínea. Esse impressionante órgão sofre contração automaticamente durante todo o período de vida do organismo – aproximadamente 3 bilhões (3×10^9) de vezes em um ser humano (**Animação 17.11**). Assim, mesmo alterações sutis na actina ou na miosina da musculatura cardíaca podem ocasionar graves doenças do coração. Por exemplo, mutações na miosina cardíaca e em outras proteínas contráteis no sarcômero causam a cardiomiopatia hipertrófica familiar, uma doença hereditária responsável pela morte súbita em atletas jovens.

QUESTÃO 17-10

A. Observe que na Figura 17-46 as moléculas de troponina estão regularmente espaçadas ao longo de um filamento de actina, sendo uma molécula de troponina encontrada a cada sete moléculas de actina. Como as moléculas de troponina podem ser posicionadas de forma tão regular? O que isso nos ensina sobre a ligação da troponina aos filamentos de actina?

B. O que aconteceria se você misturasse filamentos de actina com (i) troponina de forma isolada, (ii) tropomiosina isoladamente ou (iii) troponina mais tropomiosina e a seguir adicionasse miosina? Os efeitos observados seriam dependentes de Ca^{2+}?

A contração das células musculares constitui uma função especializada dos componentes básicos do citoesqueleto eucariótico. Nos capítulos a seguir, veremos como o citoesqueleto participa naquilo que talvez seja o movimento celular mais importante de todos – a formação de duas células-filhas durante o processo de divisão celular.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- **O citoplasma de uma célula eucariótica é sustentado e espacialmente organizado pelo citoesqueleto composto por filamentos intermediários, microtúbulos e filamentos de actina.**
- **Os filamentos intermediários são polímeros estáveis, semelhantes a cabos, compostos de proteínas fibrilares que conferem resistência mecânica às células. Alguns tipos de filamentos intermediários revestem a membrana nuclear, formando a lâmina nuclear; outros estão distribuídos ao longo do citoplasma.**
- **Os microtúbulos são tubos ocos rígidos formados pela polimerização de subunidades de dímeros de tubulina. Eles são estruturas polarizadas que contêm uma extremidade "menos" (–) de crescimento mais lento e uma extremidade "mais" (+) de rápido crescimento.**
- **Os microtúbulos são nucleados em centros organizadores, como o centrossomo, e crescem a partir desses. As extremidades menos (–) dos microtúbulos estão inseridas no centro organizador (centro nucleador).**
- **Muitos dos microtúbulos de uma célula se encontram em um estado lábil, dinâmico, no qual alternam entre um estado de crescimento e um estado de encurtamento. Essas transições, conhecidas como instabilidade dinâmica, são controladas pela hidrólise de GTP ligado aos dímeros de tubulina.**
- **Cada dímero de tubulina possui uma molécula de GTP fortemente associada que é hidrolisada em GDP após a inserção da tubulina em um microtúbulo. A hidrólise do GTP reduz a afinidade da subunidade pelas subunidades adjacentes e diminui a estabilidade do polímero, provocando sua dissociação.**
- **Os microtúbulos podem ser estabilizados por proteínas que capturam a extremidade mais (+) – um processo que influencia o posicionamento do arranjo de microtúbulos em uma célula. As células contêm diversas proteínas associadas a microtúbulos que os estabilizam, conectam-nos a outros componentes celulares e os fortalecem para o desempenho de funções específicas.**
- **As cinesinas e as dineínas são proteínas motoras que usam a energia da hidrólise de ATP para se movimentarem unidirecionalmente ao longo dos microtúbulos. Elas transportam vesículas membranares específicas, além de outras cargas, e, dessa forma, auxiliam na manutenção da organização espacial do citoplasma.**
- **Os cílios e os flagelos de eucariotos contêm um feixe de microtúbulos estáveis. Seu batimento é provocado pela flexão dos microtúbulos, induzida por uma proteína motora denominada dineína ciliar.**
- **Os filamentos de actina são polímeros helicoidais de moléculas de actina. Eles são mais flexíveis do que os microtúbulos e frequentemente são encontrados em feixes ou redes.**
- **Os filamentos de actina são estruturas polarizadas com uma extremidade de rápido crescimento e outra que apresenta crescimento lento, e sua associação e sua dissociação são controladas pela hidrólise de ATP, que está ligado a cada monômero de actina.**
- **As diversas formas e funções dos filamentos de actina nas células dependem de uma série de proteínas de ligação à actina. Essas controlam a**

polimerização dos filamentos de actina, interligam esses filamentos formando redes frouxas ou feixes rígidos, conectam os filamentos a membranas ou os movimentam uns em relação aos outros.

- Uma rede concentrada de filamentos de actina reveste internamente a membrana plasmática e forma o córtex celular, sendo responsável pela forma e pelo movimento da superfície celular, incluindo-se aqui os movimentos necessários para a migração de uma célula sobre uma superfície.
- As miosinas são proteínas motoras que utilizam a energia de hidrólise de ATP para se moverem sobre caminhos formados por filamentos de actina: elas transportam organelas através desses caminhos de filamentos de actina ou fazem com que filamentos adjacentes de actina deslizem uns sobre os outros nos feixes contráteis.
- No músculo, grandes arranjos de filamentos de actina e filamentos de miosina sobrepostos são capazes de gerar contrações por meio do movimento de deslizamento entre eles.
- A contração muscular é iniciada por um aumento súbito no Ca^{2+} citosólico, que envia um sinal para o aparelho contrátil via proteínas de ligação ao Ca^{2+}.

TERMOS-CHAVE

centríolo	flagelo
centrossomo	instabilidade dinâmica
cílio	lamelipódio
cinesina	lâmina nuclear
citoesqueleto	microtúbulo
córtex celular	miofibrila
dineína	miosina
família da proteína Rho	polaridade
filamento de actina	proteína motora
filamentos intermediários	sarcômero
filopódio	tubulina

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 17-11

Quais das seguintes sentenças estão corretas? Justifique suas respostas.

A. As cinesinas movimentam membranas do retículo endoplasmático ao longo dos microtúbulos de tal forma que uma rede de túbulos do RE é estendida através da célula.

B. Sem actina, as células podem formar um fuso mitótico funcional e separar seus cromossomos, mas não podem sofrer divisão.

C. Lamelipódios e filopódios são "órgãos sensoriais" que uma célula estende com o objetivo de localizar pontos de ancoramento no substrato sobre o qual a célula está migrando.

D. O GTP é hidrolisado pela tubulina para provocar a flexão dos flagelos.

E. As células que possuem uma rede de filamentos intermediários que não pode sofrer despolimerização irão morrer.

F. As extremidades mais (+) dos microtúbulos crescem mais rapidamente, pois possuem uma capa de GTP maior.

G. Os túbulos tranversais em células musculares são uma extensão da membrana plasmática, com a qual eles apresentam continuidade, e, de forma semelhante, o retículo sarcoplasmático é uma extensão do retículo endoplasmático.

H. A ativação do movimento da miosina em filamentos de actina é mediada pela fosforilação da troponina em algumas situações e pela ligação de Ca^{2+} à troponina em outras.

QUESTÃO 17-12

O tempo médio necessário para uma molécula ou uma organela difundir uma distância *x* em cm é dado pela fórmula

$$t = x^2/2D$$

onde *t* equivale ao tempo em segundos, e *D* é uma constante denominada coeficiente de difusão para a molécula ou partícula. Usando a fórmula anterior, calcule o tempo necessário para que uma molécula pequena, uma proteína e uma vesícula membranar difundam de um lado para o extremo oposto de uma célula que apresenta 10 μm de diâmetro. Os coeficientes de difusão típicos, em unidades de cm^2/s, são, para uma molécula pequena, 5×10^{-6}; para uma molécula proteica, 5×10^{-7}; para uma vesícula, 5×10^{-8}. Quanto tempo será necessário para que a vesícula membranar consiga chegar à extremidade de um axônio de 10 cm de comprimento se movendo por difusão livre?

QUESTÃO 17-13

Por que células eucarióticas, e especialmente células animais, possuem citoesqueletos tão grandes e complexos? Relacione as diferenças entre células animais e células bacterianas que se baseiam no citoesqueleto eucariótico.

QUESTÃO 17-14

Examine a estrutura de um filamento intermediário apresentada na Figura 17-3. O filamento apresenta uma polaridade característica, ou seja, podemos distinguir uma extremidade da outra por meio de alguma característica química ou outra qualquer? Justifique sua resposta.

QUESTÃO 17-15

Não existem proteínas motoras conhecidas que se movam ao longo dos filamentos intermediários. Sugira uma explicação para esse fato.

QUESTÃO 17-16

Quando uma célula entra em mitose, seu arranjo preexistente de microtúbulos citoplasmáticos deve ser rapidamente dissociado e substituído pelo fuso mitótico que se forma para separar os cromossomos entre as duas células-filhas. A enzima catanina, que recebeu seu nome em homenagem às espadas dos samurais japoneses, é ativada no início da mitose e fragmenta os microtúbulos em pequenos pedaços. Após terem sido gerados pela catanina, o que acontece aos fragmentos de microtúbulos? Justifique sua resposta.

QUESTÃO 17-17

O fármaco taxol, extraído da casca de uma conífera, apresenta efeito oposto ao do fármaco colchicina, um alcaloide extraído do crocus. O taxol se liga fortemente aos microtúbulos e os estabiliza; quando adicionado a células, ele faz com que grande parte da tubulina livre se associe formando microtúbulos. Em contraste, a colchicina evita a formação de microtúbulos. O taxol é tão prejudicial a células em divisão quanto a colchicina, e ambos são utilizados como fármacos anticancerígenos. Com base em seu conhecimento a respeito da dinâmica de microtúbulos, como você explica que ambos os fármacos exibam ação tóxica sobre células em divisão, apesar de possuírem ações opostas?

QUESTÃO 17-18

Uma técnica bastante útil para o estudo de motores de microtúbulos é conectá-los pelas suas caudas a lamínulas de vidro (o que pode ser realizado de forma bastante simples, pois as caudas apresentam grande avidez por uma superfície de vidro limpa) e, a seguir, permitir que os microtúbulos se assentem sobre eles. Os microtúbulos podem então ser observados sob microscopia óptica, conforme são propelidos sobre a superfície da lamínula, movidos pelas cabeças das proteínas motoras. Considerando que as proteínas motoras se ligam sob orientação aleatória à lamínula, como essas podem gerar o movimento coordenado de microtúbulos isolados, em vez de dar início a um cabo-de-guerra? Em que direção os microtúbulos migrarão sobre uma "cama" de moléculas cinesina (isto é, extremidade mais (+) à frente ou extremidade menos (-) à frente)?

QUESTÃO 17-19

Na **Figura Q17-19**, pode ser observado um típico gráfico de tempo de polimerização e formação de microtúbulos a partir de tubulina purificada.

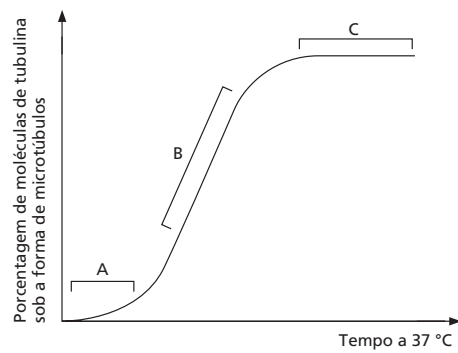



Figura Q17-19

A. Explique as diferentes partes da curva (indicadas como A, B e C). Desenhe um diagrama que ilustre o comportamento das moléculas de tubulina em cada uma das três fases.

B. O que aconteceria com a curva da figura se fossem adicionados centrossomos à reação?

QUESTÃO 17-20

As fotomicrografias eletrônicas mostradas na **Figura Q17-20A** foram obtidas a partir de uma população de microtúbulos que estavam em rápido crescimento. A Figura Q17-20B foi obtida a partir de microtúbulos que estavam sofrendo encurtamento "catastrófico". Comente todas as diferenças existentes entre as imagens e sugira explicações possíveis para as diferenças observadas.

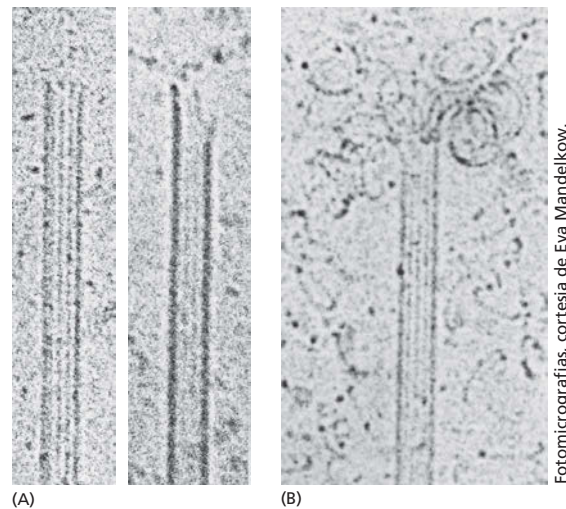



Figura Q17-20

QUESTÃO 17-21

A locomoção de fibroblastos em cultura é impedida imediatamente pela adição da citocalasina, ao passo que a adição de colchicina faz com que os fibroblastos parem de se movimentar de forma direcionada e comecem a estender lamelipódios de forma aleatória. A injeção de anticorpos antivimentina a fibroblastos não resulta em efeitos discerníveis relativos à sua capacidade de migração. O que os dados lhe sugerem em relação ao envolvimento desses três filamentos citoesqueléticos na locomoção de fibroblastos?

QUESTÃO 17-22

Complete a sentença seguinte de forma exata, explicando a razão de haver escolhido ou refutado cada um dos quatro complementos (mais de uma pode estar correta). A função do cálcio na contração muscular é

A. Desligar as cabeças de miosina do filamento de actina.

B. Transmitir o potencial de ação da membrana plasmática para a maquinaria contrátil.

C. Ligar-se à troponina, fazendo com que essa mova a tropomiosina e, consequentemente, exponha os filamentos de actina para as cabeças de miosina.

D. Manter a estrutura do filamento de miosina.

QUESTÃO 17-23

Qual das seguintes alterações ocorre na contração do músculo esquelético?

A. Os discos Z se distanciam.

B. Os filamentos de actina se contraem.

C. Os filamentos de miosina se contraem.

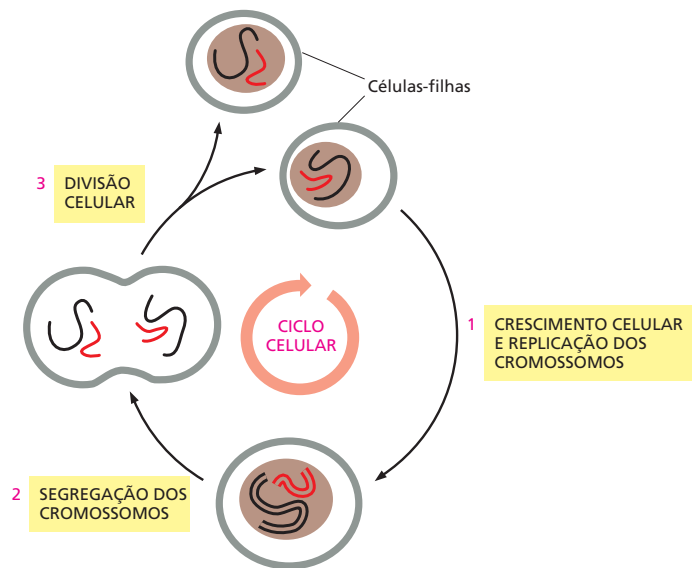
D. Os sarcômeros sofrem encurtamento.

CAPÍTULO 18

O Ciclo da Divisão Celular

"Onde surge uma célula, existia uma célula anteriormente, assim como os animais só podem surgir de animais, e as plantas, de plantas". Essa *doutrina celular,* proposta pelo patologista alemão Rudolf Virchow, em 1858, carrega consigo uma mensagem profunda para a continuidade da vida. As células são geradas a partir de células, e a única maneira de obter mais células é pela divisão daquelas que já existem. Todos os organismos vivos, desde a bactéria unicelular até o mamífero multicelular, são produtos de ciclos repetidos de crescimento e de divisão celular desde o início da vida há mais de três bilhões de anos.

Uma célula se reproduz realizando uma sequência ordenada de eventos nos quais ela duplica seu conteúdo e então se divide em duas. Esse ciclo de duplicação e divisão, conhecido como **ciclo celular**, é o principal mecanismo pelo qual todos os seres vivos se reproduzem. Os detalhes do ciclo celular variam de organismo para organismo e ocorrem em diferentes momentos na vida de um determinado organismo. Nos organismos unicelulares, como bactérias e leveduras, cada divisão celular produz um organismo novo completo, e vários ciclos de divisão celular são necessários para produzir um novo organismo multicelular a partir de um óvulo fertilizado. Entretanto, certas características do ciclo celular são universais, uma vez que permitem que cada célula realize sua tarefa mais importante – copiar e passar adiante a sua informação genética para a próxima geração de células. Para produzir duas células-filhas geneticamente idênticas, o DNA em cada cromossomo deve ser replicado fielmente, e os cromossomos replicados devem então ser primorosamente distribuídos, ou *segregados*, para dentro das duas células-filhas, de modo que cada célula receba uma cópia completa de todo o genoma (**Figura 18-1**). A maioria das células também deve duplicar as suas outras macromoléculas e organelas e duplicar de tamanho antes de dividir-se; senão, a cada vez em que elas se dividissem, ficariam menores e menores. Assim, para manter o seu tamanho, as células em divisão devem coordenar o seu crescimento com a sua divisão.

Figura 18-1 As células se reproduzem pela duplicação do seu conteúdo e pela divisão em duas, um processo chamado de ciclo de divisão celular ou ciclo celular. A divisão de uma célula eucariótica hipotética com dois cromossomos é mostrada para ilustrar como cada ciclo celular produz duas células-filhas geneticamente idênticas. Cada célula-filha pode dividir-se novamente pela passagem por outro ciclo celular.

QUESTÃO 18-1

Considere a seguinte frase: "Todas as células de hoje se originaram por uma série ininterrupta de divisões celulares, desde a primeira divisão celular". Isso está estritamente correto?

Para explicar como as células se reproduzem, devemos considerar três questões principais: (1) Como as células duplicam o seu conteúdo? (2) Como elas repartem o conteúdo duplicado e se separam em duas? (3) Como elas coordenam toda a maquinaria que é necessária para esses dois processos? O primeiro problema é discutido em outro lugar neste livro: no Capítulo 6, discutimos como o DNA é replicado, e nos Capítulos 7, 11, 15 e 17, descrevemos como a célula eucariótica produz outros componentes, como as proteínas, as membranas, as organelas e os filamentos do citoesqueleto. Neste capítulo, consideraremos o segundo e o terceiro problema: como uma célula eucariótica segrega seu conteúdo duplicado para produzir duas células-filhas e como ela coordena as várias etapas desse ciclo reprodutivo.

Começaremos com uma visão geral sobre os eventos que ocorrem durante o ciclo celular. Então, descreveremos o complexo sistema de proteínas reguladoras, chamado de *sistema de controle do ciclo celular*, que ordena e coordena esses eventos para assegurar que ocorram na sequência correta. Depois, discutiremos em mais detalhes os principais estágios do ciclo celular, nos quais os cromossomos são duplicados e então segregados para dentro das duas células-filhas. No final do capítulo, consideraremos como um animal regula o tamanho e o número de suas células e, dessa forma, o tamanho do organismo e seus órgãos: descreveremos como animais eliminam as células não desejadas por uma forma de morte celular programada chamada de *apoptose* e então discutiremos como utilizam sinais extracelulares para controlar a sobrevivência celular, o crescimento celular e a divisão celular.

VISÃO GERAL DO CICLO CELULAR

A função mais básica do ciclo celular é duplicar exatamente a vasta quantidade de DNA nos cromossomos e então distribuir de modo preciso as cópias para as células-filhas, geneticamente idênticas. A duração do ciclo celular varia muito de um tipo de célula para outro. Uma levedura unicelular pode dividir-se a cada duas horas em condições ideais, e uma célula hepática de mamíferos se divide, em média, menos do que uma vez por ano (**Tabela 18-1**). Descreveremos brevemente a sequência de eventos que ocorre em uma célula de mamífero que se divide corretamente de forma rápida (em proliferação). Daremos uma introdução ao sistema de controle do ciclo celular que assegura que os vários eventos do ciclo ocorram na sequência e no momento corretos.

TABELA 18-1 Tempo de duração de ciclos celulares de alguns eucariotos

Tipo celular	Duração do ciclo celular
Células jovens de embrião de sapo	30 minutos
Células de leveduras	1,5-3 horas
Células epiteliais de intestino de mamíferos	~12 horas
Fibroblastos de mamíferos, em cultura	~20 horas
Células hepáticas humanas	~1 ano

O ciclo celular eucariótico é dividido em quatro fases

Visto sob um microscópio, os dois eventos mais dramáticos no ciclo são quando o núcleo se divide, um processo chamado de *mitose,* e quando a célula se divide em duas, um processo chamado de *citocinese.* Esses dois processos juntos constituem a **fase M** do ciclo celular. Em uma célula de mamífero típica, toda a fase M dura cerca de uma hora, que é apenas uma pequena fração do tempo total do ciclo celular.

O período entre uma fase M e a próxima fase é chamado de **interfase**. Sob o microscópio, parece, ilusoriamente, um intervalo sem ocorrências especiais durante o qual a célula simplesmente aumenta em tamanho. Entretanto, a interfase é um momento muito atarefado para a célula e compreende as três fases restantes do ciclo celular. Durante a **fase S** (S = síntese), a célula replica o seu DNA nuclear, um pré-requisito essencial para a divisão celular. A fase S é flanqueada por duas fases, nas quais a célula continua a crescer. A **fase G_1** (G = intervalo, de *gap*) é o intervalo entre o término da fase M e o início da fase S. A **fase G_2** é o intervalo entre o final da fase S e o início da fase M (Figura 18-2). Durante essas fases de intervalo, a célula monitora o meio interno e externo para assegurar que as condições são adequadas e os preparos são completados antes que ela própria passe para a principal reviravolta da fase S e mitose. Em determinados pontos em G_1 e G_2, a célula decide se vai proceder para a próxima fase ou parar para permitir mais tempo para se preparar.

Durante toda a interfase, uma célula geralmente continua a transcrever genes, sintetizar proteínas e aumentar a massa. Juntas, as fases G_1 e G_2 proveem tempo adicional para que a célula cresça e duplique as suas organelas citoplasmáticas: se a interfase durasse apenas o tempo suficiente para a replicação do DNA, a célula não teria tempo para duplicar a sua massa antes de se dividir e, consequentemente, diminuiria de tamanho a cada divisão. Em algumas circunstâncias especiais, é isso que ocorre. Em alguns embriões animais, por exemplo, as primeiras divisões celulares após a fertilização (chamadas de *divisões de cliva-*

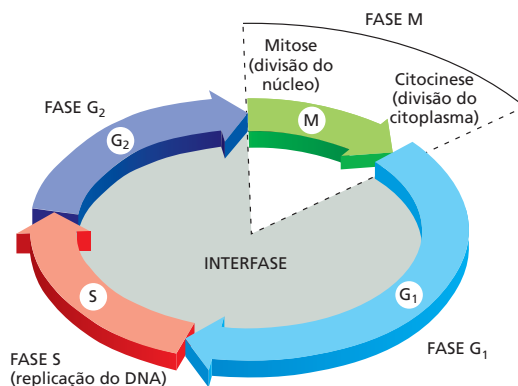
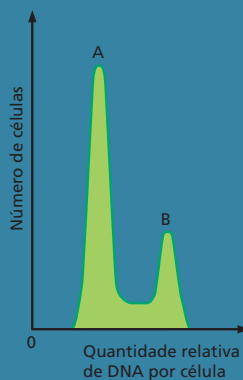



Figura 18-2 O ciclo celular é dividido em quatro fases. A célula cresce continuamente na interfase, que consiste em três fases: G_1, S e G_2. A replicação de DNA está confinada à fase S. G_1 é o intervalo entre a fase M e a fase S, e G_2 é o intervalo entre a fase S e a fase M. Durante a fase M, o núcleo se divide primeiro, em um processo chamado de mitose; então, o citoplasma se divide, em um processo chamado de citocinese.

QUESTÃO 18-2

Uma população de células em proliferação é corada com um agente corante que se torna fluorescente quando o agente se liga ao DNA, de modo que a quantidade de fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de DNA em cada célula. Para medir a quantidade de DNA em cada célula, as células são passadas por um citômetro de fluxo, um instrumento que mede a quantidade de fluorescência em células individuais. O número de células com um dado conteúdo de DNA é colocado no gráfico a seguir.

Indique no gráfico onde você esperaria encontrar células que se encontram nos seguintes estágios: G_1, S, G_2 e mitose. Qual é a fase mais longa do ciclo celular nessa população de células?

gem) servem para subdividir uma célula-ovo gigante em várias células menores, o quão rápido possível. Nesses ciclos celulares, as fases G_1 e G_2 são encurtadas drasticamente, e as células não crescem antes de se dividir.

Depois da replicação do DNA na fase S, duas cópias de cada cromossomo permanecem fortemente ligadas. O primeiro sinal visível de que uma célula está prestes a entrar na fase M é a *condensação* progressiva dos seus cromossomos. À medida que a condensação avança, os cromossomos replicados primeiro aparecem como longos cordões ao microscópio óptico, que gradualmente se encurtam e engrossam. Essa condensação diminui a probabilidade de os cromossomos se embaraçarem e torna mais fácil a segregação desses para as duas células-filhas em formação durante a mitose.

Um sistema de controle do ciclo celular aciona os principais processos do ciclo celular

Para assegurar que replicarão todo o seu DNA e organelas e se dividirão de maneira ordenada, as células eucarióticas possuem uma rede complexa de proteínas reguladoras conhecidas como *sistema de controle do ciclo celular*. Esse sistema garante que os eventos do ciclo celular – replicação do DNA, mitose e assim por diante – ocorram em um conjunto de sequências e que cada processo tenha sido completado antes que o próximo inicie. Para realizar isso, o próprio sistema de controle é regulado em determinados pontos críticos do ciclo por retroalimentação a partir dos processos que estão sendo realizados. Sem essa retroalimentação, uma interrupção ou um atraso em qualquer dos processos poderiam ser desastrosos. Todo o DNA nuclear, por exemplo, deve ser replicado antes que o núcleo comece a se dividir, o que significa que uma fase S completa deve proceder à fase M. Se a síntese de DNA é desacelerada ou parada, a mitose e a divisão celular também devem ser atrasadas. Similarmente, se o DNA é danificado, o ciclo deve interromper em G_1, S ou G_2, de modo que a célula possa reparar o dano antes que a replicação do DNA tenha sido iniciada ou completada, ou antes que a célula entre na fase M. O sistema de controle do ciclo celular executa tudo isso por meio de freios moleculares que podem parar o ciclo em vários **pontos de verificação**. Dessa maneira, o sistema de controle não aciona a próxima etapa no ciclo a não ser que a célula esteja preparada apropriadamente.

Três pontos de verificação que controlam a progressão pelo ciclo celular estão ilustrados na **Figura 18-3**. Um ponto de verificação ocorre em G_1 e permite que a célula confirme que o meio é favorável para proliferação celular antes de passar para a fase S. A proliferação em animais requer tanto nutrientes suficientes como moléculas de sinalização específicas no meio extracelular. Se as condições extracelulares são desfavoráveis, as células podem atrasar o progresso por G_1 e podem até mesmo entrar em um estado especializado de repouso conhecido como G_0 (G zero). Várias células, incluindo as células nervosas e as células do músculo esquelético, permanecem em G_0 pelo tempo de vida do organismo. Outro ponto de verificação ocorre em G_2 e assegura que as células não entrem em mitose até que o DNA danificado tenha sido reparado e a replicação de DNA esteja completa. O terceiro ponto de verificação ocorre durante a mitose e assegura que os cromossomos replicados estejam ligados apropriadamente a uma maquinaria citoesquelética chamada de fuso mitótico, antes que o fuso separe os cromossomos e os distribua para as duas células-filhas.

Os pontos de verificação em G_1 são especialmente importantes como um ponto no ciclo celular onde o sistema de controle pode ser regulado por sinais a partir de outras células. Em um animal multicelular, o sistema de controle responde muito a sinais de outras células que estimulam a divisão celular, quando mais células são necessárias, e bloqueiam a divisão, quando não são necessárias mais células. Dessa forma, o sistema de controle possui um papel central na

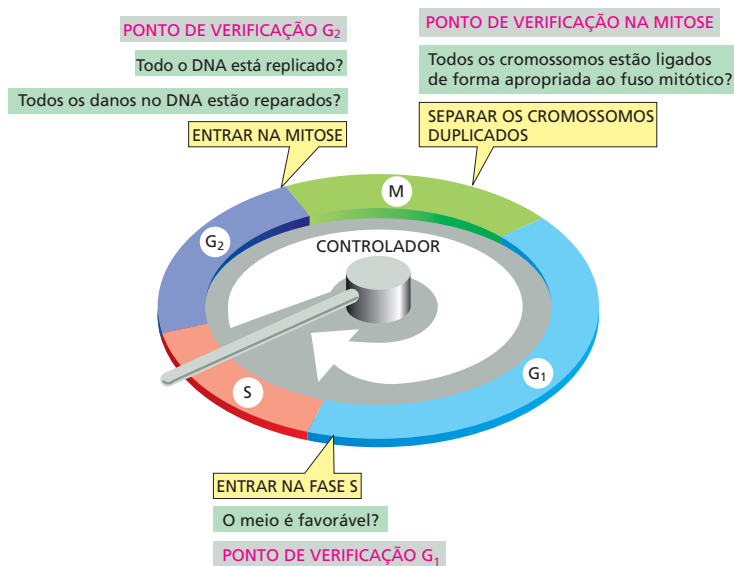



Figura 18-3 Os pontos de verificação no sistema de controle do ciclo celular asseguram que processos-chave no ciclo ocorram na sequência apropriada. O sistema de controle do ciclo celular é mostrado como um braço controlador que roda no sentido horário, acionando processos essenciais quando ele alcança determinados pontos no disco externo. Esses processos incluem a replicação do DNA na fase S e a segregação dos cromossomos duplicados na mitose. A retroalimentação a partir dos eventos intracelulares do ciclo celular, assim como os sinais a partir do meio, determina se o ciclo progredirá além de certos pontos de verificação. Três pontos de verificação proeminentes estão em destaque: o ponto de verificação em G_1 determina se a célula procede para a fase S; o ponto em G_2 determina se a célula procede para mitose, e o ponto na fase M determina se a célula está pronta para separar os cromossomos duplicados e segregá-los para duas células-filhas novas.

regulação do número de células nos tecidos do corpo. Caso o sistema não funcione de maneira correta de modo que a divisão celular seja excessiva, o câncer pode ocorrer. Mais adiante, veremos como os sinais extracelulares influenciam as decisões tomadas nesses pontos de verificação.

O controle do ciclo celular é semelhante em todos os eucariotos

Algumas características do ciclo celular, incluindo o tempo necessário para completar certos eventos, variam muito de um tipo de célula para outro, mesmo dentro de um mesmo organismo. Entretanto, a organização básica do ciclo é essencialmente a mesma em todas as células eucarióticas, e todos os eucariotos parecem usar maquinarias similares para controlar mecanismos para dirigir e regular os eventos do ciclo celular. As proteínas do sistema de controle do ciclo celular apareceram primeiro há mais de um bilhão de anos, e elas têm sido tão bem conservadas durante o curso da evolução que várias delas funcionam perfeitamente quando são transferidas de uma célula humana para uma de levedura (Como Sabemos, p. 15-16).

Por causa dessa similaridade, os biólogos podem estudar o ciclo celular e sua regulação em uma variedade de organismos e usar os achados de todos eles para montar uma figura unificada de como as células eucarióticas se dividem. Muitas descobertas sobre o ciclo celular vieram de procuras sistemáticas por mutações que inativam componentes essenciais do sistema de controle do ciclo celular nas leveduras. Estudos de células de mamíferos em cultura e embriões animais também têm sido úteis para examinar os mecanismos moleculares que governam o controle da proliferação celular em organismos multicelulares.

O SISTEMA DE CONTROLE DO CICLO CELULAR

Dois tipos de maquinaria estão envolvidos na divisão celular: uma produz os novos componentes da célula em crescimento, e a outra atrai os componentes para os seus locais corretos e os reparte apropriadamente quando a célula se divide em duas. O **sistema de controle do ciclo celular** ativa e desativa toda essa maquinaria nos momentos corretos e coordena as várias etapas do ciclo. O cen-

tro do sistema de controle do ciclo celular é uma série de mudanças bioquímicas que operam em uma determinada sequência e orquestram os principais eventos do ciclo, incluindo a replicação do DNA e a segregação dos cromossomos duplicados. Nesta seção, revisaremos os componentes proteicos do sistema de controle e discutiremos como eles funcionam juntos para acionar as diferentes fases do ciclo.

Figura 18-4 A progressão pelo ciclo celular depende de proteína-cinases dependentes de ciclinas (Cdks). Uma Cdk deve ligar-se a uma proteína reguladora denominada ciclina antes de se tornar enzimaticamente ativa. O complexo ativo ciclina-Cdk fosforila proteínas-chave na célula que são necessárias para iniciar uma determinada etapa no ciclo celular. A ciclina também auxilia a direcionar a Cdk para suas proteínas-alvo que a Cdk fosforila.

O sistema de controle do ciclo celular depende de proteína-cinases ativadas ciclicamente chamadas de Cdks

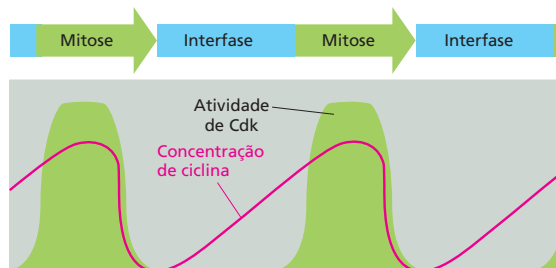
O sistema de controle do ciclo celular governa a maquinaria do ciclo celular pela ativação e pela desativação cíclicas das proteínas-chave e dos complexos proteicos que iniciam ou regulam a replicação de DNA, mitose e citocinese. Como discutido no Capítulo 4, a fosforilação seguida de desfosforilação é uma das maneiras mais comuns utilizadas pelas células para ativar e então desativar a atividade de uma proteína (ver Figura 4-38), e o sistema de controle do ciclo celular utiliza esse mecanismo repetidamente. As reações de fosforilação que controlam o ciclo celular são realizadas por um grupo específico de proteína-cinases, ao passo que a desfosforilação é realizada por um grupo de proteína-fosfatases.

As proteína-cinases que fazem parte do centro do sistema de controle do ciclo celular estão presentes nas células em proliferação por todo o ciclo celular. Entretanto, elas são ativadas apenas em determinados momentos no ciclo, depois do qual elas são rapidamente desativadas de novo. Assim, a atividade de cada uma dessas cinases aumenta e diminui de maneira cíclica. Algumas das proteína-cinases, por exemplo, tornam-se ativas no final da fase G_1 e são responsáveis por direcionar a célula para a fase S; uma outra cinase se torna ativa logo antes da fase M e é responsável por direcionar a célula para a mitose.

A ativação e a desativação das cinases no momento apropriado são de responsabilidade, parcialmente, de outro grupo de proteínas no sistema de controle – as **ciclinas**. As próprias ciclinas não têm atividade enzimática, mas elas devem ligar-se às cinases do ciclo celular antes que as cinases possam tornar-se enzimaticamente ativas. As cinases do sistema de controle do ciclo celular são, por isso, conhecidas como **proteína-cinases dependentes de ciclina**, ou **Cdks** (**Figura 18-4**). As ciclinas são assim chamadas porque, diferentemente das Cdks, as suas concentrações variam de maneira cíclica durante o ciclo celular. As alterações cíclicas nas concentrações de ciclina ajudam a direcionar a montagem cíclica e a ativação dos complexos ciclina-Cdk. A ativação desses complexos, por sua vez, aciona vários eventos do ciclo celular, como a entrada na fase S ou na fase M (**Figura 18-5**). Discutiremos como essas moléculas foram descobertas em Como Sabemos, p. 615-616.

A atividade de Cdks também é regulada pela fosforilação e pela desfosforilação

O aumento e a diminuição dos níveis de ciclina têm um papel importante na regulação da atividade de Cdk durante o ciclo celular, mas existe mais nesta

Figura 18-5 O acúmulo de ciclinas regula a atividade das Cdks. A formação de complexos ciclina-Cdk ativos dirige vários eventos do ciclo celular, incluindo a entrada na fase S ou na fase M. A figura mostra as alterações na concentração de ciclina e a atividade de Cdk responsável por controlar a entrada na fase M. O aumento na concentração de ciclina ajuda a formar o complexo ciclina-Cdk ativo que dirige a entrada na fase M. Embora a atividade enzimática do complexo ciclina-Cdk aumente e diminua durante o curso do ciclo celular, a concentração dos componentes de Cdk não altera (não mostrado).

COMO SABEMOS:
A DESCOBERTA DAS CICLINAS E DAS CDKS

Durante vários anos, os biólogos celulares observaram o "*show* de bonecos" da síntese de DNA, da mitose e da citocinese, mas não tinham ideia do que estava atrás da cortina controlando esses eventos. O sistema de controle do ciclo celular era simplesmente uma "caixa-preta" dentro da célula. Não estava claro, até mesmo, se existia um sistema de controle separado ou se a maquinaria do ciclo celular se autocontrolava de alguma forma. Um avanço veio com a identificação das proteínas-chave do sistema de controle e a concretização de que elas são distintas dos componentes da maquinaria do ciclo celular – as enzimas e outras proteínas que realizam os principais processos de replicação de DNA, segregação de cromossomos e assim por diante.

Os primeiros componentes do sistema de controle do ciclo celular a serem descobertos foram as ciclinas e as cinases dependentes de ciclinas (Cdks) que conduzem as células para a fase M. Eles foram encontrados nos estudos de divisão celular conduzidos em óvulos de animais.

De volta ao óvulo

Os óvulos fertilizados de vários animais são especialmente adequados para estudos bioquímicos do ciclo celular, pois são excepcionalmente grandes e se dividem de forma rápida. Um óvulo do sapo *Xenopus,* por exemplo, tem apenas 1 mm de diâmetro (**Figura 18-6**). Após a fertilização, ele se divide rapidamente, para dividir o óvulo em várias células menores. Esses ciclos celulares rápidos consistem principalmente em fases S e M repetidas, com pouco ou nada das fases G_1 ou G_2 entre eles. Não existe nova transcrição de genes: todos os mRNAs, assim como a maioria das proteínas, necessárias para esse estágio inicial do desenvolvimento embrionário já estão empacotadas dentro do óvulo muito grande durante o seu desenvolvimento, como um oócito no ovário da mãe. Nesses ciclos iniciais de divisão (*divisão de clivagem*), não ocorre crescimento celular, e todas as células do embrião se dividem sincronicamente.

Figura 18-6 Um óvulo maduro de *Xenopus* fornece um sistema conveniente para estudar a divisão celular. (Cortesia de Tony Mills.)

Por causa da sincronia, é possível preparar um extrato de óvulos de sapo em um determinado estágio do ciclo celular que represente aquele estágio do ciclo celular. A atividade biológica de um extrato como esse pode então ser testada pela injeção desse em um oócito de *Xenopus* (o precursor imaturo do óvulo não fertilizado) e pela observação, microscopicamente, dos seus efeitos no comportamento do ciclo celular. O oócito de *Xenopus* é um sistema-teste especialmente conveniente para detectar uma atividade que conduza as células para a fase M, por causa do seu tamanho grande, e porque ela completou a replicação do DNA e está presa a um estágio no ciclo celular meiótico (discutido no Capítulo 19), que é equivalente à fase G_2 do ciclo celular mitótico.

Dê-nos um M

Em experimentos como esse, pesquisadores observaram que um extrato de óvulo na fase M conduz o oócito instantaneamente para a fase M, ao passo que o citoplasma de um óvulo em divisão em outras fases do ciclo não o faz. Quando descoberta pela primeira vez, a identidade bioquímica e o mecanismo de ação do fator responsável por essa atividade eram desconhecidos, e a atividade era simplesmente chamada de *fator promotor da maturação*, ou MPF (de *maturation promoting factor)* (**Figura 18-7**). Pelo teste de citoplasmas de diferentes estágios do ciclo celular, foi observado que a atividade de MPF oscilava bastante durante o curso de cada ciclo celular: ela aumentava de forma rápida logo antes do início da mitose e diminuía rapidamente até zero no final da mitose (**Figura 18-8**). Essa oscilação tornou MPF um forte candidato a um componente envolvido no controle do ciclo celular.

Quando MPF foi finalmente purificado, foi observado que ele continha uma proteína-cinase que era necessária para a sua atividade. A porção MPF da cinase não atuava sozinha. Ela necessitava de uma proteína específica (agora sabidamente uma M-ciclina) ligada a ela para que funcionasse. A M-ciclina foi descoberta em um tipo diferente de experimento, envolvendo óvulos de molusco.

Pescando em moluscos

Inicialmente, a M-ciclina foi identificada como uma proteína cuja concentração aumentava de forma gradual durante a interfase e, então, diminuía rapidamente até zero à medida que os óvulos de moluscos em divisão passavam pela fase M (ver Figura 18-5). A proteína repetia essa atuação em cada ciclo celular. Entretanto, seu papel no controle do ciclo celular era obscuro inicialmente. O avanço ocorreu quando foi observado que a ciclina era um componente do MPF e era necessária para a atividade do MPF. Assim, MPF, que agora chamamos de M-Cdk, é

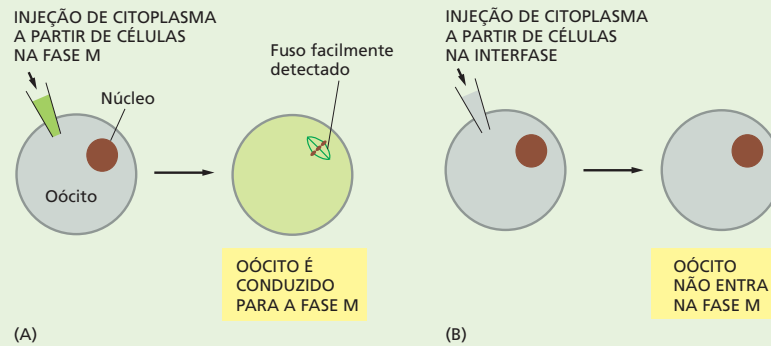



Figura 18-7 A atividade de MPF foi descoberta pela injeção de citoplasma de óvulos de *Xenopus* em oócitos de *Xenopus*. (A) Um oócito de *Xenopus* é injetado com citoplasma coletado de óvulos de *Xenopus* na fase M. O extrato celular dirige o oócito para a fase M da primeira divisão meiótica, levando à quebra do grande núcleo e à formação de um fuso. (B) Quando o citoplasma é retirado de um óvulo em divisão na interfase, isso não faz com que o oócito entre na fase M. Assim, o extrato em (A) deve conter alguma atividade – um fator promotor da maturação (MPF) – que aciona a entrada na fase M.

um complexo proteico contendo duas subunidades – uma subunidade reguladora, M-ciclina e uma subunidade catalítica, a Cdk mitótica. Depois que os componentes de Cdk foram identificados, outros tipos de ciclinas e Cdks foram isolados, cujas concentrações ou atividades, respectivamente, aumentavam e diminuíam em outros estágios do ciclo celular.

Todos na família

Enquanto os bioquímicos estavam identificando as proteínas que regulam os ciclos celulares de embriões de sapo e de molusco, os geneticistas de leveduras estavam utilizando uma abordagem diferente para dissecar o sistema de controle do ciclo celular. Pelo estudo de mutantes que param ou que se portam mal em pontos específicos no ciclo celular, esses pesquisadores foram capazes de identificar vários genes responsáveis pelo controle do ciclo celular. Alguns desses genes mostraram se codificar para proteínas como ciclina ou Cdk, que eram, de maneira clara, similares – tanto na sequência de aminoácidos como na função – às suas homólogas em sapos e moluscos. Genes similares foram logo identificados em células humanas.

Vários dos genes de controle do ciclo celular se alteraram tão pouco durante a evolução que a versão humana do gene funcionará perfeitamente em uma célula de levedura. Por exemplo, uma levedura com uma cópia defectiva do gene que codifica para a sua única Cdk falha em dividir-se; entretanto, o mutante se dividirá de modo normal se uma cópia apropriada do gene humano é introduzida artificialmente na célula defectiva. Até mesmo Darwin ficaria atônito com uma evidência dessas, de que humanos e leveduras são primos. Apesar de bilhões de anos de evolução divergente, todas as células eucarióticas – no meio de leveduras, animais ou vegetais – usam essencialmente as mesmas moléculas para controlar os eventos do seu ciclo celular.

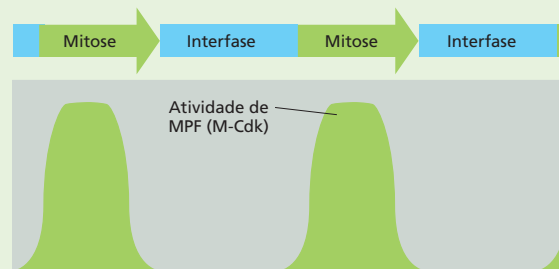



Figura 18-8 A atividade de MPF oscila durante o ciclo celular nos embriões de *Xenopus*. A atividade testada utilizando o teste mostrado na Figura 18-7 aumenta rapidamente logo antes do início da mitose e cai de forma rápida para zero no final da mitose.

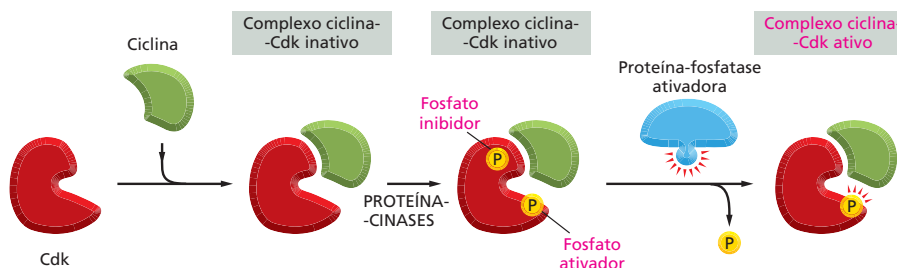



Figura 18-9 **Para que Cdk seja ativa, ela deve ser fosforilada em algum sítio e desfosforilada em outros dois sítios.** Quando ele se forma primeiro, o complexo ciclina-Cdk não está fosforilado e é inativo. Subsequentemente, Cdk é fosforilado em um sítio que é necessário para a sua atividade e em outros dois (afastados) sítios que inibem a sua atividade. Esse complexo fosforilado permanece inativo até que finalmente seja ativado por uma proteína-fosfatase que remove os dois grupos fosfato inibidores. Para simplificar, apenas um grupo fosfato inibidor é mostrado aqui.

história. As concentrações de ciclina aumentam gradualmente, mas a atividade dos complexos ciclina-Cdk associados tendem a ser ativados subitamente no momento apropriado no ciclo celular (ver Figura 18-5). Assim, o que aciona essa rápida ativação desses complexos? Para que a ciclina-Cdk esteja ativa ao máximo, a Cdk deve ser fosforilada em um sítio por uma proteína-cinase específica e desfosforilada em outro sítio por uma proteína-fosfatase específica (**Figura 18-9**). Discutiremos mais adiante como essas cinases e fosfatases regulam a atividade das ciclinas-Cdk específicas e assim controlam a progressão pelo ciclo celular.

Diferentes complexos ciclina-Cdk acionam diferentes etapas do ciclo celular

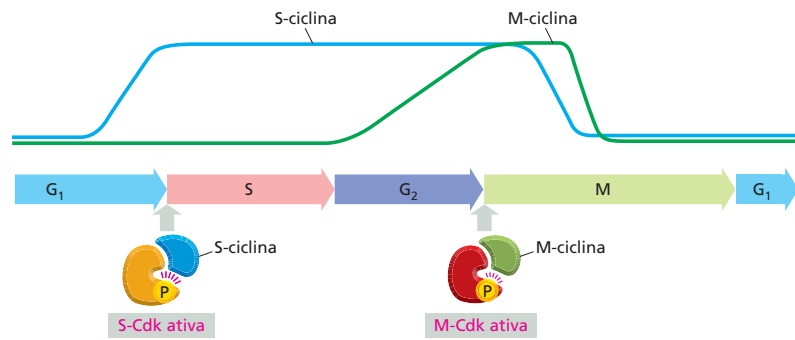
Existem vários tipos de ciclinas e, na maioria dos eucariotos, vários tipos de Cdks envolvidos no controle do ciclo celular. Diferentes complexos de ciclina-Cdk acionam diferentes etapas do ciclo celular. A ciclina que atua em G_2 para acionar a entrada na fase M é chamada de **M-ciclina**, e o complexo ativo que ela forma com sua Cdk é chamado de **M-Cdk**. Ciclinas distintas, chamadas de **S-ciclinas** e **G_1/S-ciclinas**, ligam-se a uma proteína Cdk distinta no final de G_1 para formar **S-Cdk** e **G_1/S-Cdk**, respectivamente, que acionam a fase S. A ação de S-Cdk e M-Cdk é mostrada na **Figura 18-10**. Outras ciclinas, chamadas de **G_1-ciclinas**, atuam mais cedo em G_1 e se ligam a outras proteínas Cdk para formar G_1-Cdks, que ajudam a conduzir a célula por G_1 em direção à fase S. Veremos mais adiante que a formação dessas G_1-Cdks em células animais normalmente depende de moléculas de sinalização extracelulares que estimulam as células a se dividirem. Os nomes das ciclinas individuais e de suas Cdks estão listados na **Tabela 18-2**.

Como explicado, as diferentes Cdks também devem ser fosforiladas e desfosforiladas para que possam atuar em ordem (ver Figura 18-9). Cada um desses complexos ciclina-Cdk ativados por sua vez fosforilam um grupo diferente de proteínas-alvo na célula. Como resultado, cada tipo de complexo aciona

TABELA 18-2 As principais ciclinas e Cdks de vertebrados

Complexo ciclina-Cdk	Ciclina	Parceira de Cdk
G_1-Cdk	Ciclina D*	Cdk4, Cdk6
G_1/S-Cdk	Ciclina E	Cdk2
S-Cdk	Ciclina A	Cdk2
M-Cdk	Ciclina B	Cdk1**

*Existem três ciclinas D em mamíferos (ciclinas D1, D2 e D3).
**O nome original de Cdk1 era Cdc2 nos vertebrados.

Figura 18-10 Cdks distintas se associam a diferentes ciclinas para acionar os diferentes eventos do ciclo celular. Para simplificar, apenas dois tipos de complexos ciclina-Cdk são mostrados – um que aciona a fase S e um que aciona a fase M. Em ambos os casos, a ativação de Cdk necessita da fosforilação e da desfosforilação, assim como da ligação da ciclina.

uma etapa de transição diferente no ciclo. M-Cdk, por exemplo, fosforila proteínas-chave que fazem com que os cromossomos condensem, que o envelope nuclear se quebre e que os microtúbulos do citoesqueleto se reorganizem para formar o fuso mitótico. Esses eventos anunciam a entrada na mitose, como discutiremos mais adiante.

O sistema de controle do ciclo celular também depende da proteólise cíclica

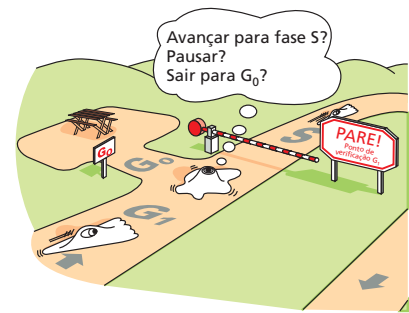
A concentração de cada tipo de ciclina aumenta gradualmente e depois diminui bastante em um determinado momento no ciclo celular (ver Figura 18-10). Essa queda brusca resulta na degradação da proteína ciclina. Complexos enzimáticos específicos adicionam cadeias de ubiquitina a ciclina apropriada, que então é direcionada ao proteassomo para ser destruída (**Figura 18-11**). Essa eliminação rápida de ciclina faz com que Cdk retorne para seu estado inativo.

Embora a ativação de Cdk acione algumas das transições a partir de uma parte do ciclo celular para a outra, sua inativação aciona outras. Por exemplo, a inativação de M-Cdk – que é acionada pela destruição de M-ciclina – conduz aos eventos moleculares que retiram a célula da mitose.

Proteínas que inibem Cdks podem interromper o ciclo celular em pontos de verificação específicos

Vimos que o sistema de controle do ciclo celular aciona os eventos do ciclo em uma ordem específica. Ele aciona a mitose, por exemplo, apenas depois que todo o DNA foi replicado e permite que a célula se divida em duas apenas depois que a mitose tenha terminado. Se uma das etapas atrasar, o sistema de controle atrasa a ativação das próximas etapas de modo que a sequência normal é mantida. Essa propriedade autorreguladora do sistema de controle assegura, por exemplo, que, se a síntese de DNA parar por alguma razão durante a fase S, a célula não prosseguirá para a fase M com apenas parte do seu DNA replicado. Como mencionado, o sistema de controle executa esse feito pela ação de freios moleculares que podem parar o ciclo celular em pontos de verificação específicos, permitindo que a célula monitore o seu estado interno e o seu meio antes de continuar pelo ciclo (ver Figura 18-3).

Figura 18-11 A atividade das Cdks é regulada pela degradação da ciclina. A ubiquitilação de uma ciclina marca a proteína para destruição nos proteassomos (como discutido no Capítulo 7). A perda de ciclina torna sua parceira Cdk inativa.

Figura 18-12 O ponto de verificação em G_1 oferece para a célula uma encruzilhada. A célula pode realizar o término de outro ciclo celular, pausar temporariamente até que as condições estejam corretas ou sair do ciclo celular como um todo e entrar em G_0. Em alguns casos, as células em G_0 podem entrar novamente no ciclo celular quando as condições melhorarem, mas muitos tipos de células saem permanentemente do ciclo celular quando diferenciam, persistindo em G_0 pelo tempo de vida do animal.

Alguns desses freios moleculares se baseiam em **proteínas inibidoras de Cdk** que bloqueiam a montagem ou a atividade de um ou mais complexos ciclina-Cdk. Certas proteínas inibidoras de Cdk, por exemplo, ajudam a manter as Cdks em um estado inativo durante a fase G_1 do ciclo, atrasando, assim, a progressão para a fase S. A parada nesse ponto de verificação dá a célula mais tempo para crescer, ou permite que ela espere até que as condições extracelulares sejam favoráveis para a divisão. Como regra geral, as células de mamíferos se multiplicarão apenas se forem estimuladas para isso por sinais extracelulares chamados de *mitógenos,* produzidos por outras células. Se privada de tais sinais, o ciclo celular para no *ponto de verificação G_1* (ver Figura 18-3). Se a célula for privada por tempo suficiente, ela sairá do ciclo celular e entrará em um estado de não proliferação G_0, no qual a célula pode permanecer por dias ou semanas ou até mesmo por todo tempo de vida do organismo (Figura 18-12).

A maior parte da diversidade na velocidade da divisão celular no corpo adulto depende da variação no tempo que a célula leva em G_0 ou em G_1. Alguns tipos de células, como as células hepáticas, normalmente se dividem apenas uma ou duas vezes por ano, e certas células epiteliais no intestino se dividem mais do que duas vezes por dia para renovar o revestimento do intestino continuamente. Muitas das nossas células estão entre esses dois pontos: elas podem dividir-se se a necessidade surgir, mas em geral não é frequente. Escapar do ponto de verificação G_1 ou do G_0 requer o acúmulo de G_1-ciclinas e a ação dos mitógenos pela estimulação desse acúmulo.

Uma vez passado o ponto de verificação G_1, a célula em geral prossegue todo o caminho pelo resto do ciclo celular rapidamente – em geral, dentro de 12-24 horas nos mamíferos. Por isso, o ponto de verificação G_1 é algumas vezes chamado de *Início*, pois a passagem por ele representa um compromisso para completar um ciclo completo de divisão, embora um nome melhor pudesse ser Parada (ver Figura 18-12). Alguns dos principais pontos de verificação do ciclo celular estão resumidos na Figura 18-13.

A decisão mais radical que um sistema de controle do ciclo celular pode fazer é tirar a célula do ciclo celular permanentemente. Isso é diferente de sair do ciclo celular temporariamente para esperar por condições mais favoráveis e possui uma importância especial nos organismos multicelulares. No corpo humano, por exemplo, células nervosas ou do músculo esquelético param permanentemente de se dividir quando se diferenciam. Elas entram em um estado G_0 irreversível no qual o sistema de controle do ciclo celular é bastante desmantelado: várias das Cdks e ciclinas desaparecem, e os complexos ciclina-Cdk que ainda estão presentes são inibidos por proteínas inibidoras de Cdk.

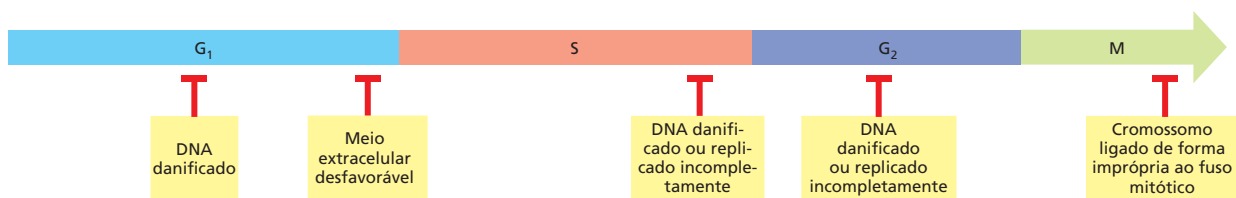



Figura 18-13 O sistema de controle do ciclo celular pode interromper o ciclo em vários pontos de verificação. Os *T* em *vermelho* representam os pontos no ciclo onde o sistema de controle pode aplicar freios moleculares (como proteínas inibidoras de Cdk) para parar a progressão em resposta ao dano no DNA, processos intracelulares que não foram completados ou um meio extracelular não favorável. O ponto de verificação indicado na fase M assegura que todos os cromossomos estão apropriadamente ligados ao fuso mitótico antes de os cromossomos duplicados serem separados.

QUESTÃO 18-3

Por que você supõe que as células desenvolveram um estado G_0 especial para sair do ciclo celular, em vez de apenas pararem em um estado G_1 no ponto de verificação de G_1?

Agora retornaremos para fase S, na qual as células replicam seu DNA e começam a preparar seus cromossomos para segregação.

FASE S

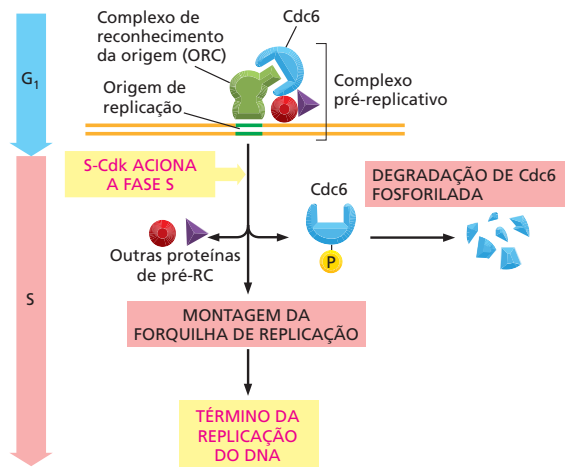
Antes que a célula se divida, ela deve replicar seu DNA. Como discutimos no Capítulo 6, essa replicação deve ocorrer com extrema acuidade para minimizar o risco de mutações na próxima geração de células. De igual importância, cada nucleotídeo no genoma deve ser copiado uma vez – e apenas uma vez – para prevenir os efeitos danosos da multiplicação gênica. Nesta seção, consideraremos os mecanismos elegantes pelos quais o sistema de controle do ciclo celular inicia o processo de replicação e, ao mesmo tempo, previne que a replicação ocorra mais de uma vez por ciclo celular.

S-Cdk inicia a replicação do DNA e auxilia a rerreplicação do bloco

Como discutimos no Capítulo 6, a replicação do DNA inicia nas *origens de replicação,* sequências nucleotídicas que estão dispersas em vários locais ao longo de cada cromossomo. Essas sequências recrutam proteínas específicas que controlam o início e o término da replicação do DNA. Um complexo multiproteico, o **complexo de reconhecimento da origem** (**ORC**, de *origin recognition complex*),permanece ligado às origens de replicação pelo ciclo celular, onde ele serve como um tipo de plataforma de aterrissagem para proteínas reguladoras adicionais que se ligam antes do início da fase S.

Uma dessas proteínas reguladoras, chamada de Cdc6, está presente em níveis baixos durante a maior parte do ciclo celular, mas a sua concentração aumenta transientemente no início de G_1. Quando Cdc6 se liga aos ORCs em G_1, ela promove a ligação de proteínas adicionais para formar o *complexo pré-replicativo.* Uma vez que o complexo pré-replicativo esteja montado, a origem de replicação está pronta para "atuar". A ativação de S-Cdk no final de G_1 então puxa o "gatilho" iniciando a replicação do DNA.

Como mostrado na **Figura 18-14**, a S-Cdk não apenas inicia o disparo da origem; ela também ajuda a prevenir a rerreplicação do DNA. A S-Cdk ativada auxilia a fosforilar Cdc6, fazendo com que ela e outras proteínas no complexo pré-replicativo se dissociem de ORC depois que uma origem tenha sido estimulada. Essa desmontagem previne que a replicação ocorra novamente na mesma origem. Além disso, para promover a dissociação, a fosforilação de Cdc6 por S-Cdk (e por M-Cdk, que se torna ativa no início da fase M) marca Cdc6 para de-

Figura 18-14 S-Cdk aciona a replicação de DNA e assegura que a replicação de DNA seja iniciada apenas uma vez por ciclo celular. ORC permanece associado à origem de replicação durante o ciclo celular. No início de G_1, a proteína reguladora Cdc6 se associa com ORC. Auxiliada por Cdc6, proteínas adicionais se ligam ao DNA adjacente, resultando na formação de um complexo pré-replicativo, que inclui as proteínas e o DNA aos quais elas estão ligadas. S-Cdk então aciona o disparo da origem por causar a formação dos complexos proteicos que iniciam a síntese de DNA (discutido no Capítulo 6). S-Cdk também ajuda a bloquear a rerreplicação, auxiliando a fosforilar Cdc6, que se dissocia da origem e é degradada.

gradação, assegurando que a replicação do DNA não seja reiniciada mais tarde no mesmo ciclo celular.

As coesinas ajudam a manter unidas as cromátides-irmãs de cada cromossomo replicado

Depois de os cromossomos terem sido replicados na fase S, as duas cópias de cada cromossomo replicado permanecem fortemente unidas como **cromátides-irmãs** idênticas. As cromátides-irmãs são mantidas unidas por complexos proteicos chamados de **coesinas**, que se montam ao longo do comprimento de cada cromátide-irmã à medida que o DNA é replicado na fase S. As coesinas formas anéis proteicos que circundam as duas cromátides-irmãs, mantendo-as unidas (**Figura 18-15**). Essa coesão entre cromátides-irmãs é crucial para a segregação adequada dos cromossomos e é completamente quebrada apenas no final da mitose para permitir que as cromátides-irmãs sejam separadas pelo fuso mitótico. Defeitos na coesão das cromátides-irmãs – em mutantes de leveduras, por exemplo – levaram a erros importantes na segregação dos cromossomos.

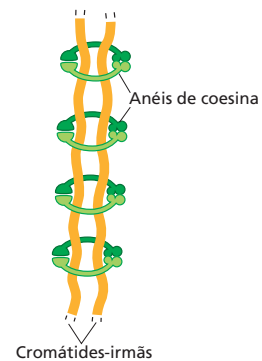



Figura 18-15 As coesinas atam as duas cromátides-irmãs adjacentes em cada cromossomo replicado. Elas formam grandes anéis proteicos que circundam as cromátides-irmãs, prevenindo que elas se separem, até que os anéis sejam rompidos no final da mitose.

Os pontos de verificação de danos ao DNA ajudam a prevenir a replicação de DNA danificado

O sistema de controle do ciclo celular utiliza vários mecanismos de pontos de verificação distintos para parar o progresso pelo ciclo celular caso o DNA esteja danificado. Os *pontos de verificação de dano ao DNA* na fase G_1 e S previnem a célula de iniciar ou completar a fase S e de replicar o DNA danificado. Outro ponto de verificação funciona em G_2 para prevenir a célula de entrar na fase M com DNA danificado ou replicado de forma incompleta (ver Figura 18-13).

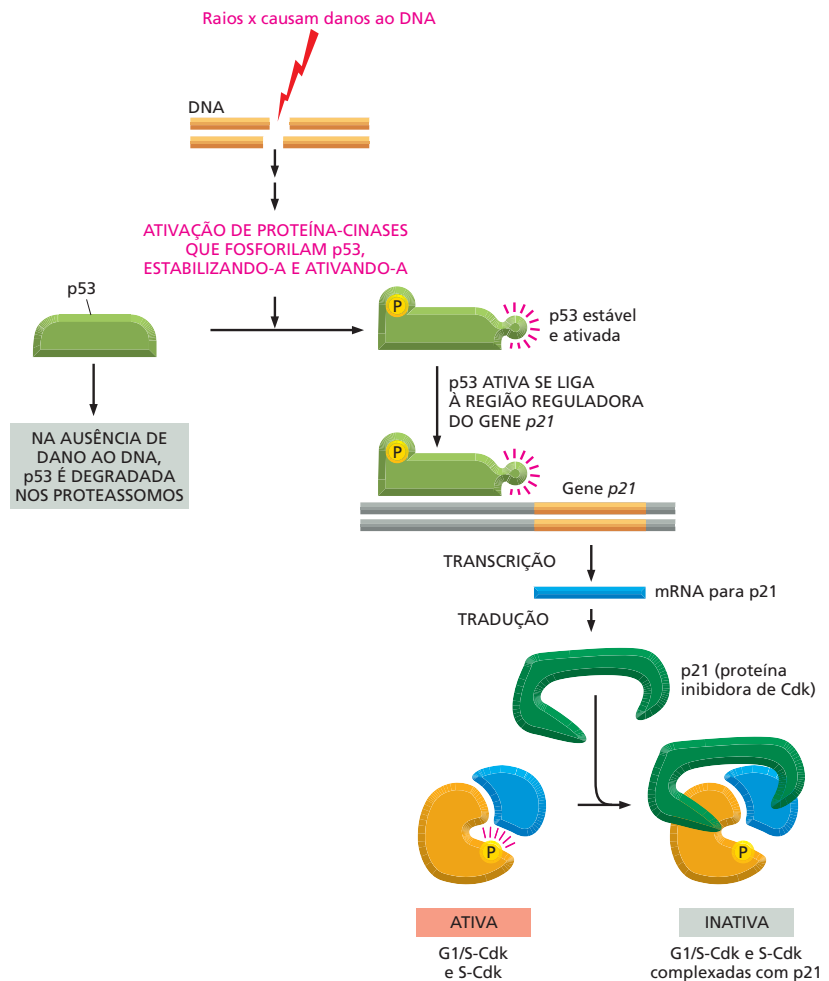
O mecanismo de ponto de verificação em G_1 é bastante compreendido. Os danos ao DNA causam um aumento tanto na concentração como na atividade de uma proteína, chamada de **p53**, que é um regulador transcricional que ativa a transcrição de um gene que codifica uma proteína inibidora de Cdk chamada de p21. A proteína p21 se liga à G_1/S-Cdk e à S-Cdk, prevenindo que elas conduzam a célula para a fase S (**Figura 18-16**). O aprisionamento do ciclo celular em G_1 permite que a célula tenha tempo para reparar o DNA danificado antes de replicá-lo. Caso o dano ao DNA seja muito severo para ser reparado, p53 pode induzir a célula a se suicidar por apoptose. Caso p53 não existir ou estiver defeituosa, a replicação irrefreável do DNA danificado conduz a uma alta taxa de mutações e a uma produção de células que tendem a tornar-se cancerosas. Mutações no gene *p53* são encontradas em cerca da metade de todos os cânceres humanos.

Uma vez que a replicação do DNA tenha iniciado, outro tipo de mecanismo de ponto de verificação opera para prevenir que a célula entre na fase M com DNA danificado ou replicado de forma incompleta. Como vimos na Figura 18-9, a atividade dos complexos ciclina-Cdk é inibida pela fosforilação em determinados sítios. Para que a célula progrida para mitose, M-Cdk deve ser ativada pela remoção dessas fosfatases inibidoras por uma proteína-fosfatase específica. Quando o DNA está danificado (ou replicado de forma incompleta), essa proteína-fosfatase ativadora é inibida, assim as fosfatases inibidoras não são removidas de M-Cdk. Como resultado, M-Cdk permanece inativa, e a fase M não pode ser iniciada até que a replicação do DNA esteja completa e qualquer dano ao DNA seja reparado.

Uma vez que a célula tenha passado por esses pontos de verificação e tenha replicado com sucesso seu DNA na fase S e progredido por G_2, a célula está pronta para entrar na fase M, na qual ela divide seu núcleo (o processo da mitose) e então seu citoplasma (o processo de citocinese) (ver Figura 18-2). Nas próximas três seções, daremos enfoque à fase M. Primeiro, apresentaremos uma breve visão geral da fase M como um todo e então discutiremos com mais detalhes os eventos que ocorrem durante a mitose e aqueles que ocorrem durante a citocinese. Nosso foco será principalmente sobre células animais.

QUESTÃO 18-4

Quais podem ser as consequências caso uma célula replique seu DNA danificado antes de repará-lo?

Figura 18-16 O dano ao DNA pode interromper o ciclo celular no ponto de verificação em G_1. Quando o DNA é danificado, proteína-cinases específicas respondem pela ativação da proteína p53 e pela parada da sua rápida degradação. A proteína p53 ativada então se acumula e se liga ao DNA (**Animação 18.1**). Lá, ela estimula a transcrição do gene que codifica para a proteína inibidora Cdk, p21. A proteína p21 se liga à G_1/S-Cdk e à S-Cdk e as inativa, de forma que o ciclo celular é interrompido em G_1.

FASE M

Embora a fase M (mitose mais citocinese) ocorra em um período relativamente curto de tempo – cerca de uma hora nas células de mamíferos que se dividem uma vez ao dia, ou mesmo uma vez ao ano –, ela é, de longe, a fase mais importante do ciclo celular. Durante esse breve período, a célula reorganiza praticamente todos os seus componentes e os distribui de forma igual entre as duas células-filhas. As fases anteriores do ciclo celular, de fato, servem para estabelecer o momento para o drama da fase M.

O problema central para a célula na fase M é separar precisamente e segregar os seus cromossomos, os quais foram replicados na fase anterior S, de modo que cada célula-filha receba uma cópia idêntica do genoma. Com pequenas variações, todos os eucariotos resolvem esse problema de modo similar: eles reúnem a maquinaria especializada do citoesqueleto que puxa os cromossomos duplicados (durante a mitose) e divide o citoplasma em duas metades (citocinese). Iniciaremos nossa discussão sobre a fase M com uma visão geral na qual consideraremos como a célula coloca o processo da fase M em movimento. Então, endereçaremos à mitose e à citocinese.

M-Cdk dirige a entrada na fase M e na mitose

Uma das características mais marcantes do controle do ciclo celular é que um único complexo proteico, M-Cdk, organiza todos os arranjos diversos e intrinca-

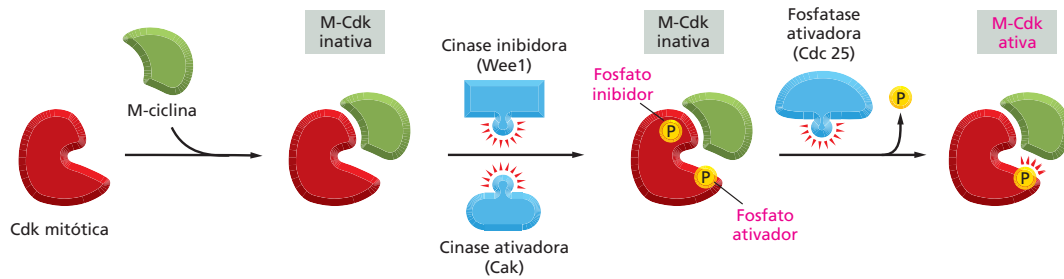



Figura 18-17 Para que M-Cdk seja ativa, ela deve ser fosforilada em alguns sítios e desfosforilada em outros. O complexo M-ciclina-Cdk é enzimaticamente inativo quando formado. Subsequentemente, Cdk é fosforilada em um sítio que é necessário para a sua atividade, por uma enzima chamada de cinase ativadora de Cdk, Cak (**Animação 18.2**). Ela também é fosforilada em outros dois sítios afastados que inibem sua atividade (por uma enzima denominada Wee1). Para simplificar, apenas um grupo fosfato inibidor é mostrado. Ainda não está claro como a escolha do momento desse complexo processo de ativação é controlada.

dos que ocorrem nos estágios iniciais da mitose. M-Cdk aciona a condensação dos cromossomos replicados em estruturas semelhantes a bastões compactos preparando-os para segregação, e ela também induz a montagem do fuso mitótico que separará os cromossomos condensados e os segregará para duas células-filhas.

Como discutido, a ativação de M-Cdk inicia com o acúmulo de M-ciclina (ver Figura 18-10). A síntese de M-ciclina inicia logo depois da fase S; a sua concentração então aumenta gradualmente e ajuda a definir o momento de início da fase M. O aumento da proteína M-ciclina leva a um acúmulo correspondente dos complexos M-Cdk. Esses complexos, quando são formados pela primeira vez, são inativos. A ativação súbita dos estoques de M-Cdk no final de G_2 é acionada pela ativação de uma proteína-fosfatase (Cdc25) que remove as fosfatases inibidoras que mantêm a atividade de Cdk em cheque (**Figura 18-17**).

Uma vez ativada, cada complexo M-Cdk pode ativar indiretamente mais M-Cdk, por fosforilar e ativar mais Cdc25, como ilustrado na **Figura 18-18**. Além disso, M-Cdk ativada também inibe a cinase inibidora Wee1 (ver Figura 18-17), promovendo a ativação de M-Cdk. A consequência geral é que, uma vez que a ativação de M-Cdk inicia, há um aumento explosivo da atividade de Cdk, que dirige a célula abruptamente de G_2 para a fase M.

As condensinas ajudam a configurar cromossomos duplicados para a separação

Quando a célula está próxima de entrar na fase M, os cromossomos replicados condensam e se tornam estruturas visíveis semelhantes a fios. Complexos proteicos, denominados **condensinas**, auxiliam a realizar essa **condensação cromossômica**. A M-Cdk que inicia a entrada na fase M ativa a reunião dos complexos de condensinas ao DNA pela fosforilação de algumas das subunidades das condensinas. A condensação torna os cromossomos mitóticos mais compactos, reduzindo-os a pequenos pacotes físicos que podem ser segregados mais facilmente no aglomerado da célula em divisão.

As condensinas estão estruturalmente relacionadas às coesinas – as proteínas mantêm as cromátides-irmãs unidas (ver Figura 18-15). Tanto as coesinas como as condensinas formam estruturas em anel, e, juntos, os dois tipos de anéis proteicos ajudam a configurar os cromossomos replicados para a mitose. As coesinas se montam sobre o DNA quando esse se replica na fase S e mantêm fortemente unidas duas moléculas paralelas de DNA – as cromátides-irmãs idênticas. As condensinas, ao contrário, se reúnem a cada cromátide individual no início da fase M e se enrolam sobre o DNA para ajudar que cada cromátide se condense (**Figura 18-19**).

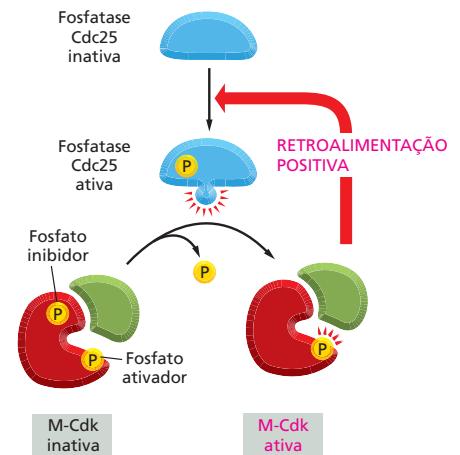



Figura 18-18 M-Cdk ativada indiretamente ativa mais Cdk, criando uma alça de retroalimentação positiva. Uma vez ativada, M-Cdk fosforila e assim ativa mais fosfatases ativadoras de Cdk (Cdc25). Agora, a fosfatase pode ativar mais M-Cdk pela remoção dos grupos fosfato inibidores da subunidade Cdk.

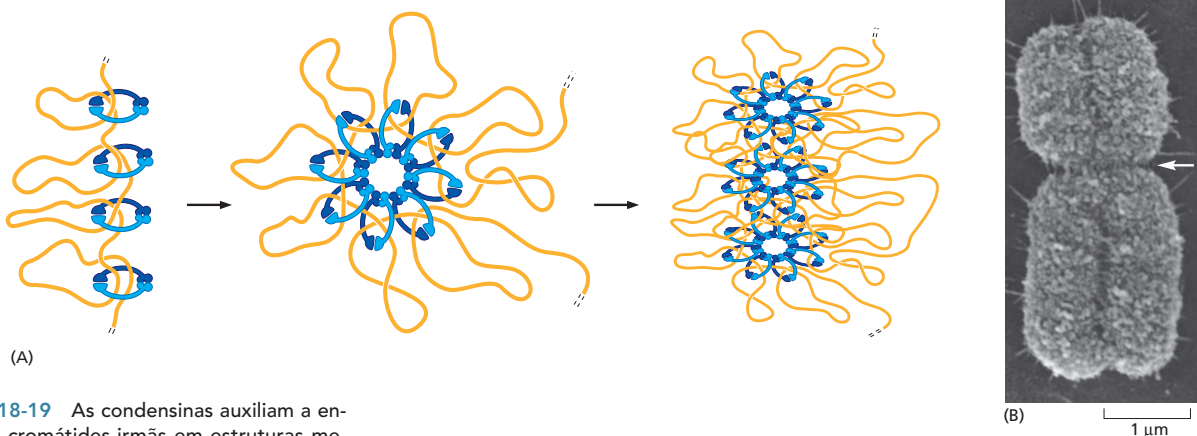



Figura 18-19 As condensinas auxiliam a enrolar as cromátides-irmãs em estruturas menores mais compactas que podem ser mais facilmente segregadas durante a mitose. (A) Um modelo de como as proteínas condensina podem compactar uma única cromátide pelo enrolamento de longas alças de DNA. (B) Uma micrografia eletrônica de varredura de um cromossomo mitótico humano replicado, que consiste em duas cromátides-irmãs ligadas em toda sua extensão. A região de constrição (seta) é o centrômero, onde cada cromátide se ligará ao fuso mitótico, que separa as cromátides-irmãs em direção ao final da mitose. (B, cortesia de Terrys D. Allen.)

O citoesqueleto realiza tanto a mitose como a citocinese

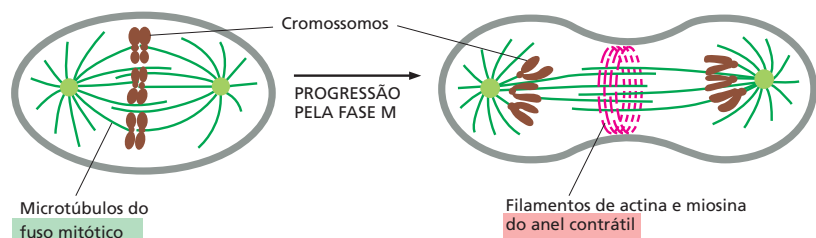
Após a condensação dos cromossomos replicados, duas estruturas citoesqueléticas complexas se reúnem em sequência para realizar os dois processos mecânicos que ocorrem na fase M. O *fuso mitótico* realiza a divisão nuclear (mitose), e, em células animais e muitos eucariotos unicelulares, o *anel contrátil* realiza a divisão citoplasmática (citocinese) (Figura 18-20). Ambas as estruturas são rapidamente dissociadas após terem realizado suas funções.

O fuso mitótico é composto de microtúbulos e de várias proteínas que interagem com eles, incluindo as proteínas motoras associadas aos microtúbulos (discutidas no Capítulo 17). Em todas as células eucarióticas, o fuso mitótico é responsável por separar os cromossomos replicados e alocar uma cópia de cada cromossomo para cada célula-filha.

O *anel contrátil* consiste principalmente em filamentos de actina e miosina, arranjados em um anel ao redor do equador da célula (discutido no Capítulo 17). Ele inicia sua formação ao final da mitose logo abaixo da membrana plasmática. Quando o anel contrai, ele puxa a membrana para o interior, dividindo a célula em duas (ver Figura 18-20). Discutiremos mais tarde como as células vegetais, que possuem parede celular, dividem seu citoplasma por um mecanismo bem diferente.

A fase M é convencionalmente dividida em seis estágios

Embora a fase M ocorra como uma sequência contínua de eventos, ela é tradicionalmente dividida em seis estágios. Os primeiros cinco estágios da fase M – prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase e telófase – constituem a **mitose**, a qual é originalmente definida como o período no qual os cromossomos estão visíveis (pois se tornaram condensados). A *citocinese* constitui o sexto estágio,

Figura 18-20 Duas estruturas transientes do citoesqueleto fazem a mediação da fase M nas células animais. O fuso mitótico é formado primeiro para separar os cromossomos replicados. A seguir, ocorre a formação do anel contrátil para dividir a célula em duas. O fuso mitótico se baseia em microtúbulos, ao passo que o anel contrátil se baseia em filamentos de actina e miosina. As células vegetais usam mecanismos bastante distintos para dividir o citoplasma, como será visto posteriormente.

o qual se sobrepõe no tempo com o final da mitose. Os seis estágios da fase M estão resumidos no **Painel 18-1** (p. 626-627). Juntos, eles formam uma sequência dinâmica na qual muitos ciclos independentes – envolvendo os cromossomos, o citoesqueleto e os centrossomos – são coordenados para produzir duas células-filhas geneticamente idênticas.

Os cinco estágios da mitose ocorrem em uma ordem sequencial estrita, na qual a citocinese se inicia na anáfase e continua pela telófase. Durante a *prófase,* os cromossomos replicados se condensam e o fuso mitótico inicia sua formação fora do núcleo. Durante a *pró-metáfase,* o envelope nuclear é destruído, permitindo que os microtúbulos do fuso se liguem aos cromossomos. Durante a *metáfase,* o fuso mitótico puxa todos os cromossomos para o centro do fuso (equador). Durante a *anáfase,* as duas cromátides-irmãs de cada cromossomo replicado se dividem sincronicamente, e o fuso puxa-os para os polos opostos da célula. Durante a *telófase,* o envelope nuclear é reconstituído ao redor de cada dois grupos de cromossomos separados para formar os dois núcleos (**Animação 18.3** e **Animação 18.4**). A citocinese é completada no final da telófase, quando o núcleo e o citoplasma de cada célula-filha voltam à interfase, sinalizando o final da fase M.

QUESTÃO 18-5

Uma pequena quantidade de citoplasma isolada a partir de uma célula mitótica é injetada em um oócito de sapo não fertilizado, fazendo com que o oócito entre na fase M (ver Figura 18-7A). Uma amostra do citoplasma de oócito injetado é então coletada e injetada em um segundo oócito, fazendo com que essa célula também entre na fase M. O processo é repetido várias vezes até que, essencialmente, nada da amostra da proteína original permaneça, e, mesmo assim, o citoplasma coletado do último, em uma série de oócitos injetados, ainda é capaz de acionar a entrada para a fase M sem a diminuição da eficiência. Explique essa observação notável.

MITOSE

Antes do início da divisão celular, ou mitose, cada cromossomo foi replicado e consiste em duas cromátides-imãs idênticas mantidas unidas ao longo de seu comprimento por proteínas coesivas (ver Figura 18-15). Durante a mitose, as proteínas coesina são clivadas, as cromátides-irmãs se separam, e os cromossomos-filhos resultantes são puxados para os polos opostos da célula pelo fuso mitótico (**Figura 18-21**). Nesta seção, veremos como o fuso mitótico é formado e como ele atua. Discutiremos como a instabilidade dinâmica dos microtúbulos e a atividade das proteínas motoras associadas aos microtúbulos contribuem tanto para a montagem do fuso como para a habilidade de segregar as cromátides-irmãs. Finalmente, revisaremos o mecanismo de ponto de verificação que opera na mitose para assegurar a separação sincronizada das cromátides-irmãs, a segregação apropriada dos dois grupos de cromossomos para as duas células-filhas e a saída ordenada no momento correto da mitose.

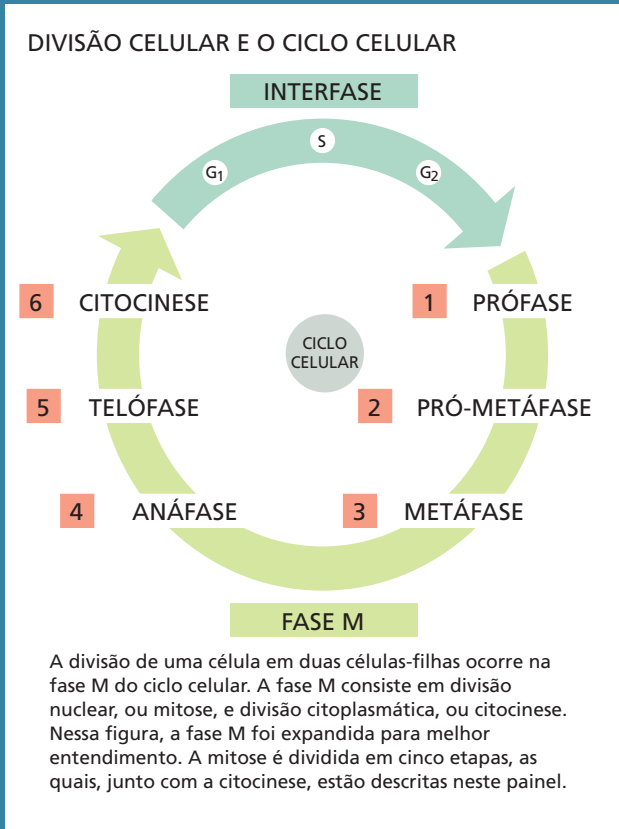
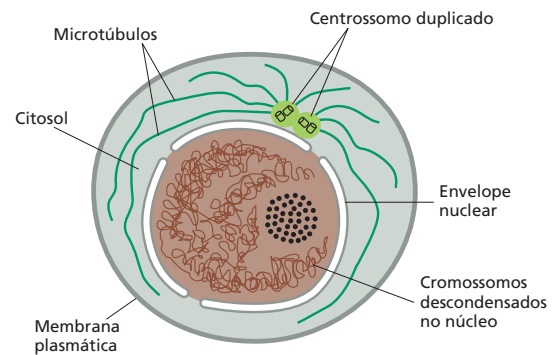
Os centrossomos são duplicados para auxiliar a formação dos dois polos do fuso mitótico

Antes do início da fase M, dois eventos críticos devem estar completos: o DNA deve estar completamente replicado, e, nas células animais, o centrossomo deve ser duplicado. O **centrossomo** é o principal *centro organizador de microtúbulos* das células animais. Ele duplica de modo que possa auxiliar na formação dos dois polos do fuso mitótico e de modo que cada célula-filha possa receber seu próprio centrossomo.

Figura 18-21 No início da anáfase, cada par de cromátides-irmãs se separa. Os cromossomos-filhos resultantes são então puxados para os polos opostos da célula pelo fuso mitótico.

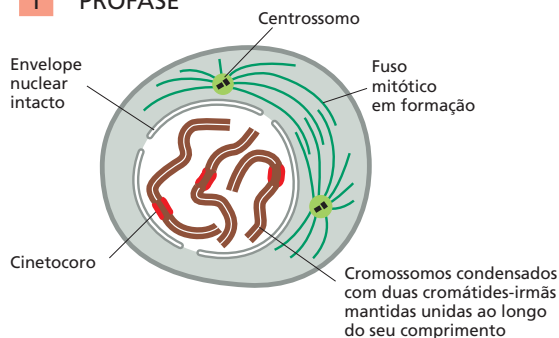
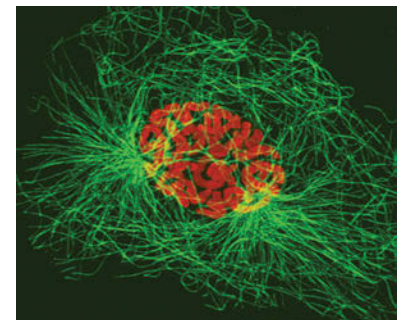
PAINEL 18-1 Os principais estágios da fase M em uma célula animal

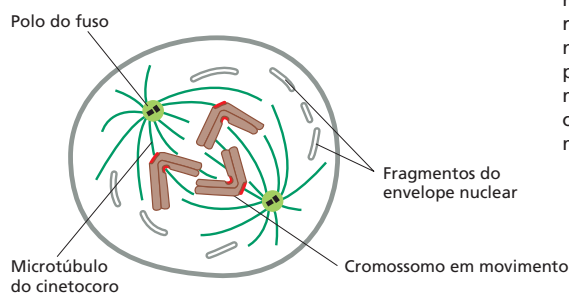
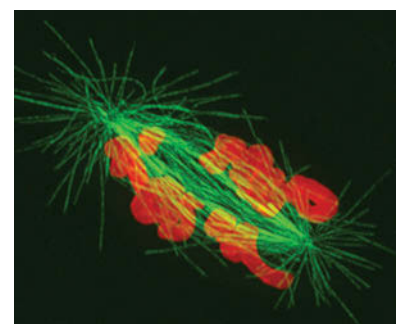
DIVISÃO CELULAR E O CICLO CELULAR

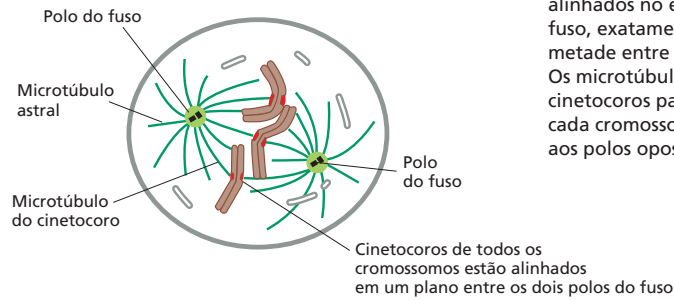
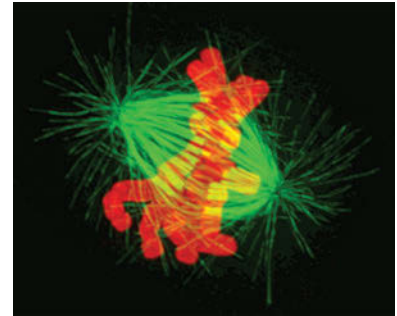
A divisão de uma célula em duas células-filhas ocorre na fase M do ciclo celular. A fase M consiste em divisão nuclear, ou mitose, e divisão citoplasmática, ou citocinese. Nessa figura, a fase M foi expandida para melhor entendimento. A mitose é dividida em cinco etapas, as quais, junto com a citocinese, estão descritas neste painel.

INTERFASE

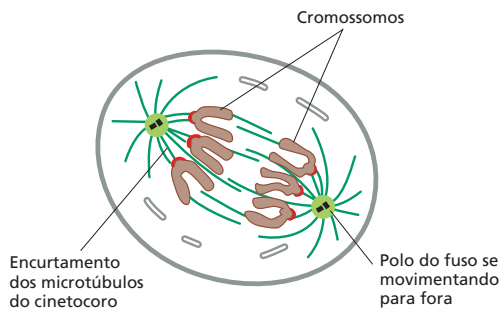
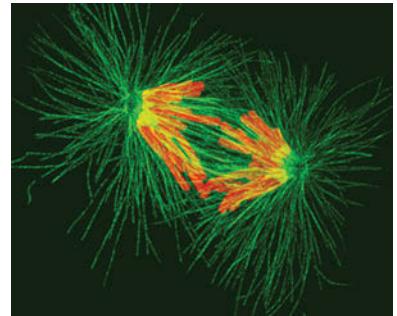
Durante a interfase, a célula aumenta de tamanho. O DNA dos cromossomos é replicado, e o centrossomo é duplicado.

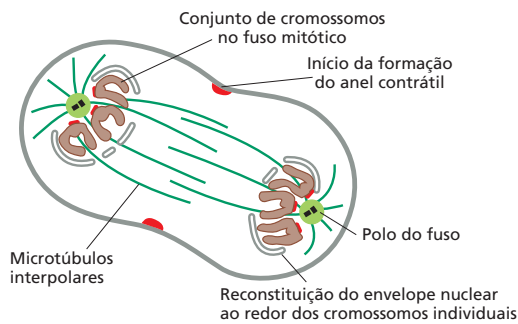
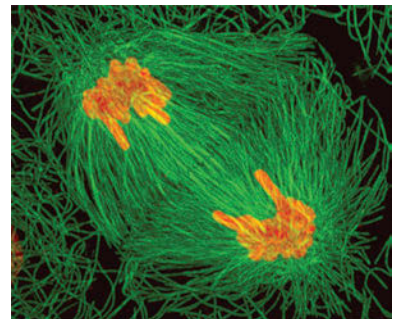
Nas micrografias óticas de células animais em divisão, mostradas neste painel, os cromossomos estão corados de *laranja*, e os microtúbulos, de *verde*. (Micrografias, cortesia de Julie Canman e Ted Salmon; "Metafase" da capa de *J. Cell. Sci*. 115(9), 2002, com permissão de The Company of Biologists Ltd; "Telophase" de J.C. Canman *et al*., Nature 424:1074-1078, 2003, com permissão de Macmillan publishers Ltd.)

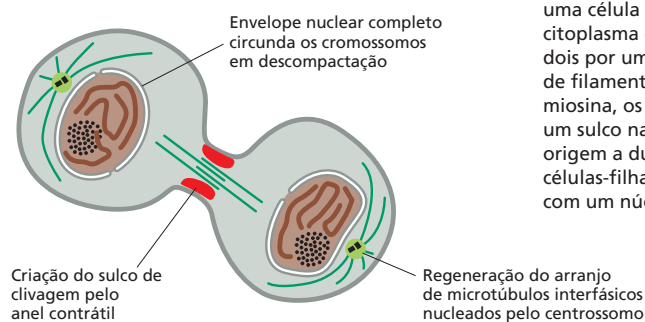
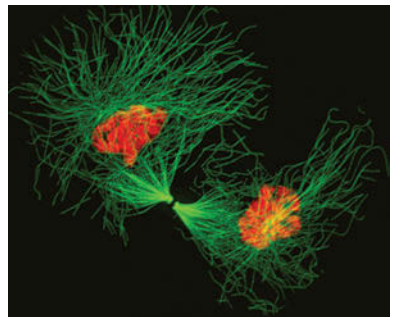
1 PRÓFASE

Na prófase, os cromossomos replicados, cada um consistindo em duas cromátides-irmãs intimamente associadas, condensam-se. Fora do núcleo, o fuso mitótico se forma entre os dois centrossomos, os quais começaram a se separar. Para simplificar, apenas três cromossomos estão desenhados.

Tempo = 0 min

2 PRÓ-METÁFASE

A pró-metáfase se inicia repentinamente com o rompimento do envelope nuclear. Os cromossomos podem agora se ligar aos microtúbulos do fuso pelo cinetocoro e sofrem movimentos ativos.

Tempo = 79 min

3 METÁFASE

Na metáfase, os cromossomos estão alinhados no equador do fuso, exatamente na metade entre os dois polos. Os microtúbulos dos cinetocoros pareados em cada cromossomo se ligam aos polos opostos do fuso.

Tempo = 250 min

4 ANÁFASE

Na anáfase, as cromátides-irmãs se separam sincronicamente, e cada uma delas é puxada lentamente para o polo do fuso ao qual está ligado. Os microtúbulos do cinetocoro encurtam, e os polos do fuso também se distanciam, contribuindo para a segregação dos cromossomos.

Tempo = 279 min

5 TELÓFASE

Durante a telófase, os dois conjuntos de cromossomos chegam aos polos do fuso. Um novo envelope nuclear é remontado em torno de cada conjunto, completando a formação dos dois núcleos e marcando o fim da mitose. A divisão do citoplasma começa com a formação do anel contrátil.

Tempo = 315 min

6 CITOCINESE

Durante a citocinese de uma célula animal, o citoplasma é dividido em dois por um anel contrátil de filamentos de actina e miosina, os quais formam um sulco na célula para dar origem a duas células-filhas, cada uma com um núcleo.

Tempo = 362 min

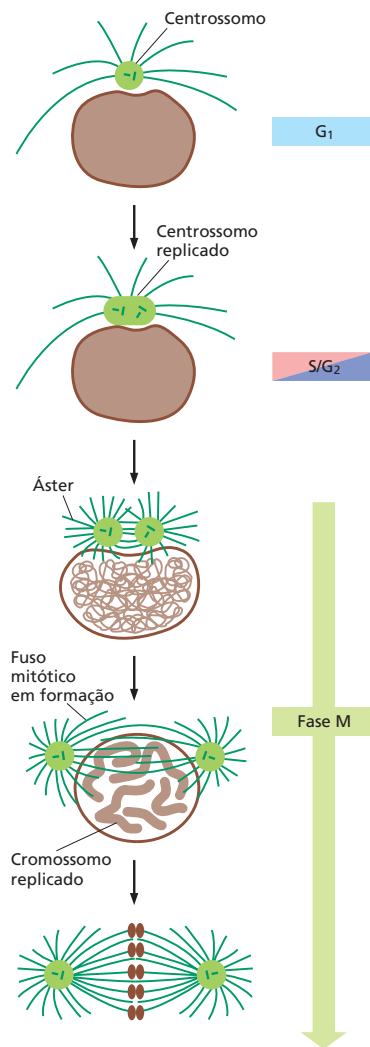



Figura 18-22 O centrossomo nas células interfásicas duplica para formar os dois polos do fuso mitótico. Na maioria das células animais na interfase (G_1, S e G_2), um par de centríolos (aqui desenhados como um par de *barras verde-escuras*) está associado à matriz do centrômero (*verde-claro*) que controla o crescimento do microtúbulo. (O volume da matriz do centrossomo está exagerado nesse diagrama por questões de clareza.) A duplicação do centrossomo se inicia no começo da fase S e se completa no final da fase G_2. Inicialmente, os dois centrômeros permanecem juntos, mas no início da fase M se separam em dois, cada um formando seu próprio áster. Os dois ásteres então se movem e se distanciam, e os microtúbulos que interagem entre os dois ásteres, preferencialmente, alongam-se para formar o fuso mitótico bipolar com um áster em cada polo. Quando o envelope nuclear é desfeito, os microtúbulos do fuso são capazes de interagir com os cromossomos.

A duplicação do centrossomo inicia no começo da fase S e é acionada pelas mesmas Cdks (G_1/S-Cdk e S-Cdk) que acionam a replicação de DNA. Inicialmente, quando os cromossomos duplicam, ambas as cópias permanecem unidas como um único complexo ao lado do núcleo. Entretanto, quando a mitose inicia, os dois cromossomos se separam, e cada um irradia um arranjo radial de microtúbulos chamado de **áster**. Os dois ásteres se movem para os polos opostos do núcleo para formar os dois polos do fuso mitótico (Figura 18-22). O processo de duplicação e separação dos centrossomos é conhecido como o **ciclo do centrossomo**.

A formação do fuso mitótico se inicia na prófase

O fuso mitótico começa a se formar na **prófase**. Essa formação do fuso altamente dinâmico depende de propriedades notáveis dos microtúbulos. Como discutido no Capítulo 17, os microtúbulos polimerizam e despolimerizam pela adição ou perda de suas subunidades de tubulina, e filamentos individuais se alternam entre crescimento e encurtamento – um processo chamado de *instabilidade dinâmica* (ver Figura 17-11). No inicio da mitose, a instabilidade dinâmica dos microtúbulos aumenta, em parte porque M-Cdk fosforila as proteínas associadas aos microtúbulos que influenciam a estabilidade dos filamentos de microtúbulos. Como resultado, durante a prófase, os microtúbulos em rápido crescimento e encurtamento se estendem em todas as direções a partir dos dois centrossomos, explorando o interior da célula. Alguns dos microtúbulos crescentes de um centrossomo interagem com os microtúbulos do outro centrossomo. Essa interação estabiliza os microtúbulos, prevenindo sua despolimerização, e os liga a dois grupos de microtúbulos unidos para formar a estrutura básica do **fuso mitótico**, que apresenta uma forma bipolar característica (Animação 18.5). Os dois centrossomos que dão origem a esses microtúbulos são agora denominados **polos do fuso**, e os microtúbulos que interagem são denominados *microtúbulos interpolares* (Figura 18-23). A formação do fuso é dirigida, em parte, por proteínas motoras associadas aos microtúbulos interpolares que auxiliam na ligação cruzada dos dois grupos de microtúbulos.

No próximo estágio da mitose, os cromossomos replicados se ligam ao fuso de tal forma que, quando as cromátides-irmãs se separam, elas são levadas aos polos opostos da célula.

Os cromossomos se ligam ao fuso mitótico na pró-metáfase

A **pró-metáfase** se inicia repentinamente com a dissociação do envelope nuclear, o qual é quebrado em várias vesículas de membrana pequenas. Esse processo é iniciado pela fosforilação e consequente dissociação das proteínas do poro nuclear e proteínas do filamento intermediário da lâmina nuclear, uma rede de proteínas fibrosas que sustenta e estabiliza o envelope nuclear (ver Figura 17-7). Os microtúbulos do fuso, que estão aguardando do lado de fora do nú-

Figura 18-23 O fuso mitótico bipolar é formado pela estabilização seletiva dos microtúbulos que interagem. Novos microtúbulos crescem dos dois centrômeros em diversas direções. As duas extremidades de um microtúbulo [por convenção, denominadas extremidades mais (+) e menos (-)], apresentam propriedades diferentes, e é a extremidade menos (-) que está ancorada ao centrossomo (discutido no Capítulo 17). As extremidades mais (+) livres são dinamicamente instáveis e mudam de forma repentina de um crescimento uniforme (setas *vermelhas* que apontam para fora) a um rápido encurtamento (setas *vermelhas* que apontam para dentro). Quando dois microtúbulos de centrossomos opostos interagem na região de sobreposição, as proteínas motoras e outras proteínas associadas aos microtúbulos fazem a ligação cruzada dos microtúbulos (pontos *pretos*), de forma que estabilizam as extremidades mais (+), diminuindo a probabilidade de sua despolimerização.

cleo, agora têm acesso aos cromossomos replicados e se ligam a eles (ver Painel 18-1, p. 626).

Os microtúbulos do fuso terminam ligados aos cromossomos por um complexo de proteínas especializadas denominado **cinetocoro**, o qual se reúne nos cromossomos condensados durante o final da prófase (Figura 18-24). Como discutido, cada cromossomo replicado é constituído por duas cromátides-irmãs ligadas ao longo de sua extensão, e cada cromátide possui uma constrição em uma região de uma sequência de DNA especializada denominada *centrômero* (ver Figura 18-19B). Logo antes da pró-metáfase, as proteínas do cinetocoro se reúnem em um grande complexo em cada centrômero. Cada cromossomo duplicado, portanto, possui dois cinetocoros (um em cada cromátide-irmã) direcionados para lados opostos. A reunião dos cinetocoros depende da presença da sequência de DNA do centrômero: na ausência dessa sequência, os cinetocoros não são formados, e, consequentemente, os cromossomos não segregam corretamente durante a mitose.

Uma vez desfeito o envelope nuclear, um microtúbulo que encontra um cromossomo se liga a ele, capturando o cromossomo. O microtúbulo finalmente se liga ao cinetocoro, e esse *microtúbulo do cinetocoro* liga o cromossomo a um polo do fuso (ver Figura 18-24 e Painel 18-1, p. 626). Como os cinetocoros das cromátides-irmãs estão voltados para polos opostos, eles tendem a se ligar aos microtúbulos de polos opostos do fuso, de modo que cada cromossomo replicado se liga aos dois polos do fuso. A ligação aos polos opostos, chamada de **biorientação**, gera tensão sobre os cinetocoros, que estão sendo puxados para direções opostas. Essa tensão sinaliza para os cinetocoros-irmãos de que eles estão ligados de forma correta e estão prontos para serem separados. O sistema de controle do ciclo celular monitora essa tensão para assegurar a ligação cor-

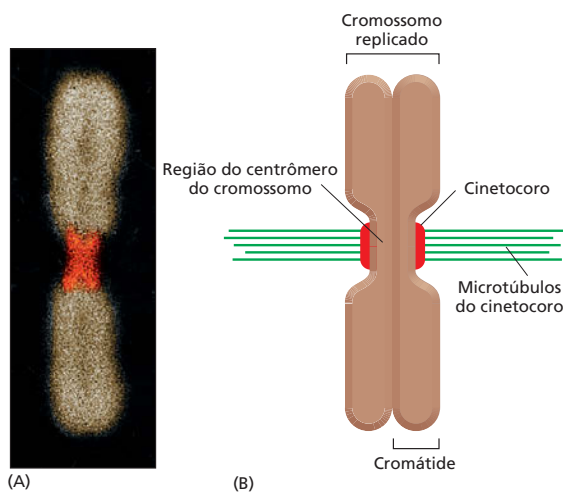
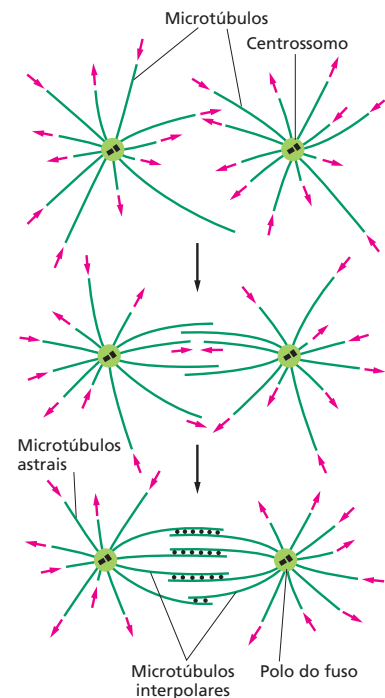



Figura 18-24 Os cinetocoros ligam os cromossomos ao fuso mitótico. (A) Micrografia de fluorescência de um cromossomo mitótico replicado. O DNA está corado com um corante fluorescente, e os cinetocoros estão corados em *vermelho* com um anticorpo fluorescente que reconhece as proteínas do cinetocoro. Esses anticorpos são de pacientes que sofrem de escleroderma (uma doença que causa superprodução progressiva de tecido conectivo na pele e em outros órgãos), os quais, por motivos desconhecidos, produzem anticorpos contra suas próprias proteínas do cinetocoro.

(B) Diagrama esquemático de um cromossomo mitótico mostrando as duas cromátides-irmãs ligadas aos microtúbulos do cinetocoro, que se ligam por suas extremidades mais (+). Cada cinetocoro forma uma placa na superfície do centrômero. (A, cortesia de B.R. Brinkley.)

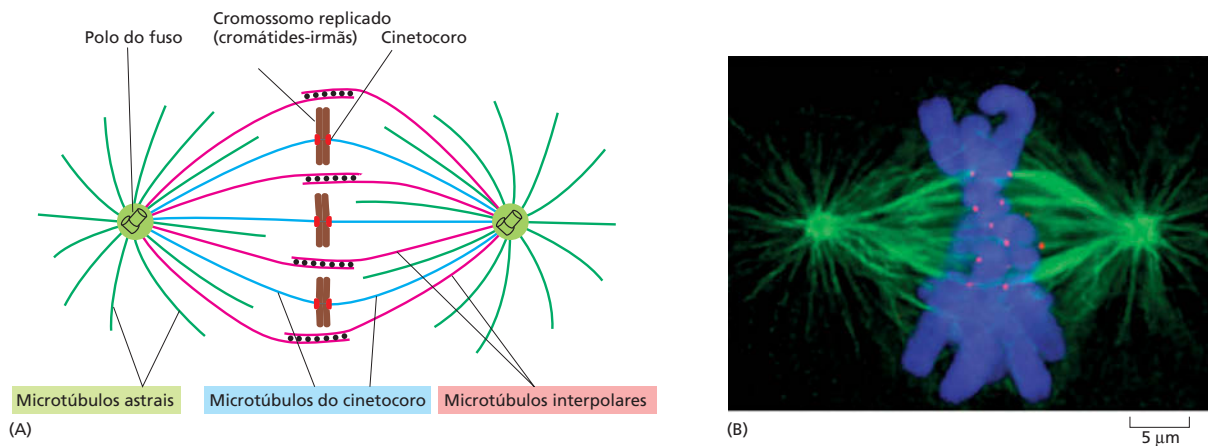



Figura 18-25 Três classes de microtúbulos compõem o fuso mitótico. (A) Desenho esquemático de um fuso com os cromossomos ligados, mostrando os três tipos de microtúbulos do fuso, os microtúbulos astrais, os microtúbulos do cinetocoro e os microtúbulos interpolares. Na realidade, os cromossomos são maiores do que o mostrado, e normalmente múltiplos microtúbulos são ligados a cada cinetocoro. (B) Micrografia de fluorescência dos cromossomos na placa metafásica de um fuso mitótico real. Nesta imagem, os cinetocoros estão marcados em *vermelho*, os microtúbulos, em *verde*, e os cromossomos, em *azul*. (B, de A. Desai, *Curr. Biol.* 10:R508, 2000. Com permissão de Elsevier.)

reta dos cromossomos, constituindo outro ponto de verificação importante do ciclo celular (ver Figuras 18-3 e 18-13).

O número de microtúbulos ligados a cada cinetocoro varia entre as espécies: cada cinetocoro humano liga 20-40 microtúbulos, por exemplo, ao passo que o cinetocoro de levedura liga apenas um microtúbulo. As três classes de microtúbulos que formam o fuso mitótico estão representadas na **Figura 18-25**.

Os cromossomos auxiliam na formação do fuso mitótico

Os cromossomos são mais do que passageiros passivos no processo de formação do fuso: eles podem estabilizar e organizar os microtúbulos em fusos mitóticos funcionais. Nas células sem centrossomos – incluindo todos os tipos de células vegetais e alguns animais –, os próprios cromossomos centralizam a formação dos microtúbulos, e as proteínas motoras então movem e organizam os microtúbulos e cromossomos em um fuso bipolar funcional. Mesmo nas células animais que normalmente possuem centrossomos, um fuso bipolar ainda pode ser formado por esses meios se os centrossomos forem removidos (**Figura 18-26**). Nas células com centrossomos, os cromossomos, as proteínas motoras e os centrossomos trabalham juntos para formar o fuso mitótico.

Os cromossomos se alinham no equador do fuso durante a metáfase

Durante a pró-metáfase, os cromossomos, agora ligados ao fuso mitótico, iniciam seu movimento para um lado e para outro. Finalmente, eles se alinham no

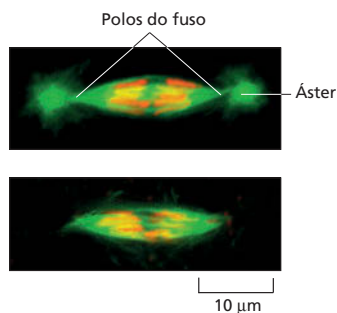



Figura 18-26 As proteínas motoras e os cromossomos podem organizar a formação de um fuso bipolar funcional na ausência dos centrossomos. Nessas micrografias de fluorescência de embriões do inseto *Sciara*, os microtúbulos estão corados em *verde*, e os cromossomos, em *vermelho*. A micrografia superior mostra um fuso normal formado com centrômeros em um embrião fertilizado normalmente. A micrografia inferior mostra um fuso formado sem centrossomos em um embrião que iniciou o desenvolvimento sem fertilização e por isso está desprovido de centrossomo, o qual é normalmente fornecido pelo esperma quando fertiliza o óvulo. Note que o fuso com centrossomos possui um áster em cada polo, ao passo que o fuso formado sem centrossomos não possui áster. Ambos os tipos de fuso são capazes de segregar os cromossomos-filhos. (De B. de Saint Phalle e W. Sullivan, *J. Cell Biol.* 141:1383-1391, 1998. Com permissão de The Rockfeller University Press.)

Figura 18-27 Durante a metáfase, os cromossomos se reúnem na região entre os dois polos do fuso. Esta micrografia de fluorescência mostra múltiplos fusos mitóticos na metáfase do embrião da mosca-das-frutas *(Drosophila)*. Os microtúbulos estão corados em *vermelho*, e os cromossomos, em *verde*. Neste estágio do desenvolvimento de *Drosophila*, há múltiplos núcleos em um grande compartimento citoplasmático, e todos esses núcleos se dividem sincronicamente; por isso, todos os núcleos aqui mostrados estão no mesmo estágio do ciclo celular: metáfase (**Animação 18.6**). Os fusos da metáfase normalmente são representados em duas dimensões, como aqui; entretanto, quando observados em três dimensões, os cromossomos são visualizados agrupados em uma região semelhante a uma placa no equador do fuso – assim denominada placa metafásica. (Cortesia de William Sullivan.)

equador do fuso, a uma distância equivalente entre os dois polos, formando a *placa metafásica.* Isso define o início da **metáfase** (**Figura 18-27**). Embora as forças que levam os cromossomos para o equador não sejam bem entendidas, acredita-se que tanto o crescimento e a retração dos microtúbulos como a ação das proteínas motoras dos microtúbulos estejam envolvidos. O balanço contínuo de adição e a perda de subunidades de tubulina são também necessários para a manutenção do fuso na metáfase: quando a adição de tubulina às extremidades dos microtúbulos é bloqueada pelo fármaco colchicina, a perda de tubulina continua até que o fuso desapareça.

Os cromossomos reunidos no equador do fuso metafásico oscilam para frente e para trás, ajustando continuamente suas posições, indicando que o cabo de guerra entre os microtúbulos ligados aos polos opostos do fuso continua a atuar após o alinhamento dos cromossomos. Se um dos cinetocoros do par for artificialmente danificado por um feixe de *laser* durante a metáfase, o cromossomo inteiro imediatamente se move em direção ao polo ao qual ele permaneceu ligado. Igualmente, se a ligação entre as cromátides-irmãs é rompida, as duas cromátides se separam e se movem para polos opostos. Esses experimentos mostraram que os cromossomos da placa metafásica são ali mantidos sob grande tensão. Evidentemente, as forças que irão separar as cromátides-irmãs iniciam logo após a ligação dos microtúbulos aos cinetocoros.

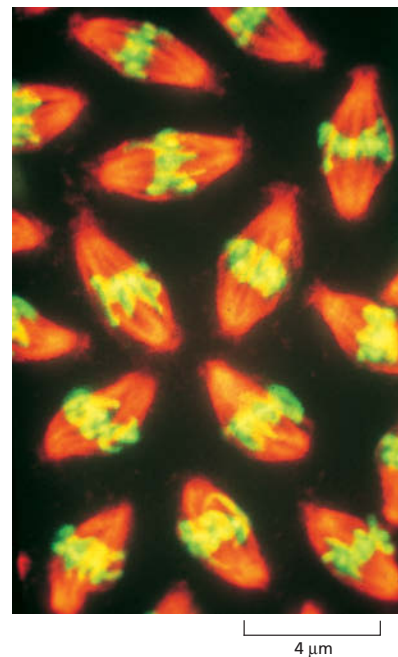
A proteólise aciona a separação das cromátides-irmãs e a finalização da mitose

A **anáfase** se inicia repentinamente com a liberação da ligação de coesina que mantém as cromátides-irmãs unidas (ver Figura 18-15). Isso permite que cada cromátide seja puxada para os polos do fuso ao qual estão ligadas (**Figura 18-28**). Esse movimento segrega os dois grupos de cromossomos idênticos para as extremidades opostas do fuso (ver Painel 18-1, p. 627).

A ligação das coesinas é destruída por uma protease chamada de *separase*, que até o começo da anáfase é mantida em um estado inativo pela ligação a uma proteína inibidora chamada de *securina*. No início da anáfase, a securina é marcada para ser destruída por um complexo proteico chamado de **complexo promotor da anáfase** (**APC**). Uma vez que a securina foi removida, a separase é então liberada para romper as ligações das coesinas (**Figura 18-29**).

O APC não apenas aciona a degradação das coesinas, mas também marca a M-ciclina para destruição, tornando, assim, o complexo M-ciclina inativo. Essa inativação rápida de M-Cdk auxilia a iniciar a saída da mitose.

Os cromossomos segregam durante a anáfase

Uma vez que as cromátides-irmãs se separam, elas são puxadas para o polo do fuso ao qual estão ligadas. Todas elas se movimentam a uma mesma velocidade, que normalmente é de cerca de 1 µm por minuto. O movimento é

QUESTÃO 18-6

Se uma fina agulha de vidro for usada para manipular um cromossomo dentro de uma célula viva durante o início da fase M, é possível enganar os cinetocoros das duas cromátides-irmãs e fazer com que eles se liguem ao mesmo polo do fuso. Esse arranjo é, normalmente, instável, mas as ligações podem ser estabilizadas se a agulha for usada com cuidado para puxar os cromossomos de modo que os microtúbulos ligados a ambos os cinetocoros (e ao mesmo polo do fuso) estejam sob tensão. O que isso sugere a respeito do mecanismo pelo qual os cinetocoros normalmente se tornam ligados e permanecem ligados aos microtúbulos de polos opostos do fuso? Essas observações são consistentes com a possibilidade de que um cinetocoro seja programado para se ligar aos microtúbulos de um determinado polo do fuso? Explique sua reposta.

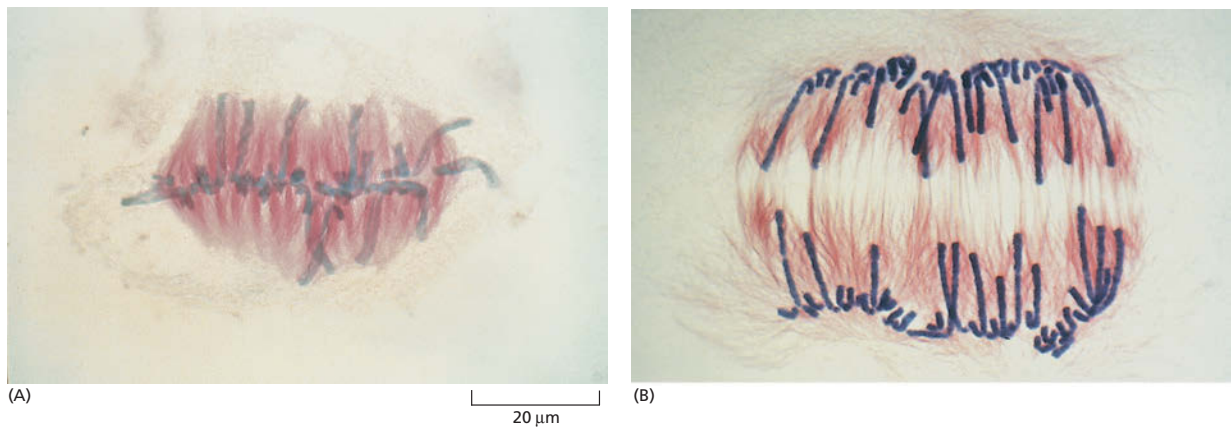



Figura 18-28 As cromátides-irmãs se separam na anáfase. Na transição da metáfase (A) para a anáfase (B), as cromátides-irmãs (coradas em *azul)* se separam repentinamente e se movem em direção aos polos opostos, como observado nessas células vegetais coradas com anticorpos, marcados com ouro, para marcar os microtúbulos (*vermelho*). As células vegetais geralmente não possuem centrossomos e, portanto, apresentam os polos do fuso menos definidos do que as células animais (ver Figura 18-35D). Os fusos do polo estão presentes aqui na parte superior e inferior de cada micrografia, embora não possam ser vistos. (Cortesia de Andrew Bajer.)

consequência de dois processos independentes que envolvem diferentes partes do fuso mitótico. Os dois processos são denominados *anáfase A* e *anáfase B* e ocorrem mais ou menos simultaneamente. Na anáfase A, os microtúbulos do cinetocoro, encurtados pela despolimerização, e os cromossomos ligados se movem em direção aos polos. Na anáfase B, os polos do fuso se distanciam, contribuindo para a segregação dos dois conjuntos cromossômicos (**Figura 18-30**).

A força que coordena os movimentos da anáfase A é fornecida, principalmente, pela ação das proteínas motoras associadas aos microtúbulos que se localizam no cinetocoro, auxiliadas pelo encurtamento dos microtúbulos do cinetocoro. A perda das subunidades de tubulina a partir dos microtúbulos do cinetocoro depende de uma proteína semelhante às motoras que está ligada tanto

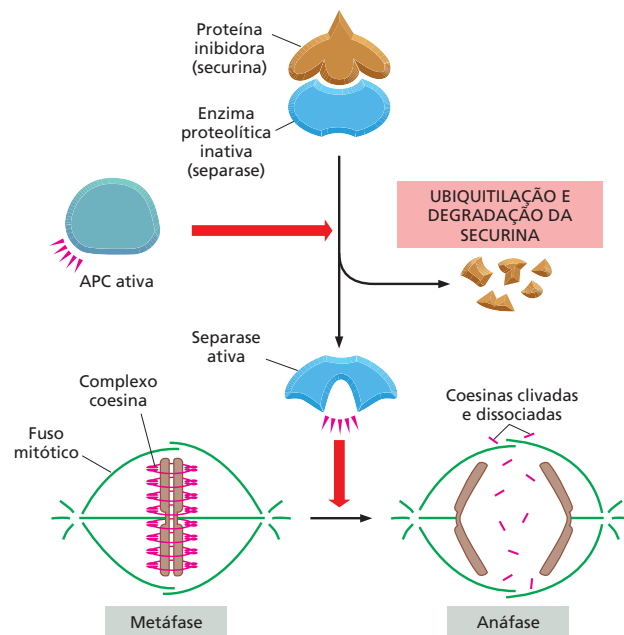



Figura 18-29 A APC ativa a separação das cromátides-irmãs, promovendo a destruição das coesinas. As APCs ativadas intensificam indiretamente a clivagem das coesinas que mantêm as cromátides-irmãs unidas. Ela catalisa a ubiquitilação e a destruição de uma proteína inibidora chamada de securina. A securina inibe a atividade de uma enzima proteolítica chamada de separase; quando livre da securina, a separase cliva os complexos de coesinas, permitindo que o fuso mitótico separe as cromátides-irmãs.

Figura 18-30 Dois processos segregam os cromossomos-filhos na anáfase. Na *anáfase A*, os cromossomos-filhos são puxados para os polos opostos à medida que os microtúbulos do cinetocoro despolimerizam. A força que coordena esse movimento é gerada, principalmente, no cinetocoro. Na *anáfase B*, os dois polos do fuso se afastam como resultado de duas forças distintas: (1) o alongamento e o deslizamento dos microtúbulos interpolares que passam um pelo outro separam os dois polos, e (2) forças exercidas pelos microtúbulos astrais direcionados para fora em cada polo do fuso separam os polos um do outro, em direção ao córtex celular. Acredita-se que todas essas forças dependem da ação das proteínas motoras associadas aos microtúbulos.

aos microtúbulos como ao cinetocoro e utiliza a energia da hidrólise do ATP para remover as subunidades de tubulina do microtúbulo.

Na anáfase B, os polos do fuso e os dois conjuntos de cromossomos se distanciam. Acredita-se que as forças que coordenam esses movimentos sejam fornecidas por dois conjuntos de proteínas motoras – membros das famílias da cinesina e da dineína (ver Figura 17-20) – que atuam em diferentes tipos de microtúbulos do fuso. Um grupo de proteínas motoras atua nos longos microtúbulos interpolares em sobreposição que formam o próprio fuso; essas proteínas motoras deslizam os microtúbulos interpolares dos polos opostos uns pelos outros no equador do fuso, afastando os polos dos fusos. O outro grupo atua nos microtúbulos astrais que se estendem dos polos do fuso em direção à periferia da célula. Acredita-se que essas proteínas motoras estejam associadas ao córtex celular, o qual sustenta a membrana plasmática e puxam cada polo em direção ao córtex adjacente e para longe do outro polo (ver Figura 18-30).

Cromossomos não ligados bloqueiam a separação das cromátides-irmãs

Se uma célula em divisão está para começar a segregar seus cromossomos antes de todos os cromossomos estarem ligados apropriadamente ao fuso, uma célula-filha receberia um grupo incompleto de cromossomos, e a outra filha receberia um excedente. Ambas as situações poderiam ser letais para a célula. Assim, uma célula em divisão deve assegurar que cada cromossomo esteja ligado de forma apropriada ao fuso antes de completar a mitose. Para monitorar a ligação do cromossomo, a célula faz uso de um sinal negativo: cromossomos não ligados enviam um sinal de parada para o sistema de controle do ciclo celular. Embora a natureza exata do sinal permaneça elusiva, sabemos que inibe a progressão pela mitose por meio do bloqueio da ativação da APC. Sem APC ativa, as cromátides-irmãs permanecem unidas. Assim, nenhum dos cromossomos duplicados pode ser separado até que todos os cromossomos se tenham posicionado corretamente sobre o fuso mitótico. Esse ponto de verificação da formação do fuso controla a saída da mitose (ver Figuras 18-3 e 18-13).

Figura 18-31 O envelope nuclear é rompido e formado novamente durante a mitose. A fosforilação das proteínas do poro nuclear e laminas auxiliam a ativar a dissociação do envelope nuclear na pró-metáfase. A desfosforilação das proteínas do poro e as laminas na telófase auxiliam a reverter o processo.

O envelope nuclear é reconstituído na telófase

No final da anáfase, os cromossomos-filhos já se separaram em dois conjuntos iguais em cada polo do fuso. Durante a **telófase**, o estágio final da mitose, o fuso mitótico se desmonta, e um envelope nuclear é reconstituído ao redor de cada conjunto cromossômico para formar os dois núcleos-filhos. Inicialmente, as vesículas da membrana nuclear se agrupam ao redor dos cromossomos individuais e então se fundem para formar o novo envelope nuclear (ver Painel 18-1, p. 627). Durante esse processo, as proteínas dos poros nucleares e as laminas nucleares que foram fosforiladas durante a pró-metáfase são agora desfosforiladas, o que permite que se reconstituam e formem o envelope nuclear e a lâmina nuclear, respectivamente (Figura 18-31). Uma vez refeito o envelope nuclear, os poros bombeiam proteínas nucleares para dentro, o núcleo se expande, e os cromossomos mitóticos compactados relaxam para seu estado interfásico. A transcrição gênica agora pode ocorrer como consequência da descompactação. Um novo núcleo foi criado, e a mitose é completada. Tudo que falta para a célula é completar sua divisão em duas células-filhas separadas.

QUESTÃO 18-7

Considere os eventos que levam à formação do novo núcleo na telófase. Como as proteínas nucleares e citosólicas se tornam apropriadamente reorganizadas para que o novo núcleo contenha as proteínas nucleares, e não as proteínas citosólicas?

CITOCINESE

A **citocinese** é o processo pelo qual o citoplasma é clivado em dois, completando a fase M. Normalmente começa na anáfase, mas não é finalizada até que os dois núcleos-filhos tenham sido formados na telófase. Enquanto a mitose depende de uma estrutura transiente com base em microtúbulos, o fuso mitótico, a citocinese nas células animais depende de uma estrutura transiente com base em filamentos de actina e miosina, *o anel contrátil* (ver Figura 18-20). No entanto, o plano de clivagem e o momento da citocinese são determinados pelo fuso mitótico.

O fuso mitótico determina o plano da clivagem citoplasmática

O primeiro sinal visível da citocinese nas células animais é o enrugamento e a formação de um sulco na membrana plasmática que ocorre durante a anáfase (Figura 18-32). O sulco, invariavelmente, ocorre no plano perpendicular ao eixo mais longo do fuso mitótico. Esse posicionamento assegura que o *sulco de clivagem* corte entre os dois conjuntos de cromossomos segregados, de

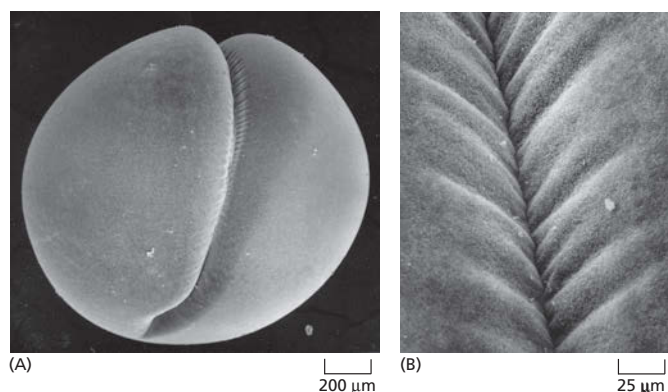



Figura 18-32 O sulco de clivagem é formado pela ação de um anel contrátil abaixo da membrana plasmática. Nessa micrografia eletrônica de varredura de um óvulo fertilizado de sapo, em divisão, o sulco de clivagem está bem-definido, de forma não usual. (A) Uma visão com pouco aumento da superfície do óvulo. (B) Uma visão de maior aumento do sulco de clivagem. (De H.W. Beams e R.G. Kessel, *Am. Sci.* 64:279-290, 1976. Com permissão de Sigma Xi.)

modo que cada célula-filha receba um conjunto idêntico e completo de cromossomos. Se, logo após o aparecimento do sulco, o fuso mitótico é propositalmente deslocado (usando uma fina agulha de vidro), o sulco desaparece, e logo se forma outro em uma posição correspondente à nova localização e à orientação do fuso. Entretanto, uma vez que o processo de formação do sulco já tenha iniciado, a clivagem continua mesmo que o fuso mitótico seja artificialmente retirado da célula ou despolimerizado com a colchicina. Ainda é um mistério como o fuso mitótico coordena a posição do sulco de clivagem, mas parece que, durante a anáfase, tanto os microtúbulos astrais como os microtúbulos interpolares (e suas proteínas associadas) sinalizam para o córtex da célula para iniciar a formação do anel contrátil em uma posição intermediária entre os fusos dos polos. Como esses sinais se originam no fuso da anáfase, esse mecanismo também contribui para definir o momento da citocinese no final da mitose.

Quando o fuso mitótico está em uma posição central na célula – a situação mais comum da maioria das células em divisão –, as duas células-filhas produzidas serão de igual tamanho. Durante o desenvolvimento embrionário, entretanto, há algumas situações nas quais a célula em divisão movimenta seus fusos mitóticos para uma posição assimétrica, e, consequentemente, o sulco cria duas células-filhas que diferem em tamanho. Na maioria dos casos, as células-filhas também diferem nas moléculas que herdam e, normalmente, desenvolvem-se em diferentes tipos celulares. Mecanismos especiais são necessários para posicionar o fuso mitótico excentricamente em tais *divisões assimétricas*.

O anel contrátil das células animais é formado por actina e miosina

O anel contrátil é composto, principalmente, de uma sobreposição de filamentos de actina e miosina (**Figura 18-33**). Ele se forma na anáfase e se liga às proteínas associadas à membrana na face citoplasmática da membrana plasmática. Uma vez montado, o anel contrátil é capaz de exercer uma força forte o suficiente para curvar uma fina agulha de vidro inserida na célula antes da citocinese. Os deslizamentos dos filamentos de actina sobre os filamentos de miosina geram uma força (ver Figura 17-39), assim como ocorre durante a contração muscular. Entretanto, diferentemente do aparelho contrátil muscular, o anel contrátil é uma estrutura transitória: ela se forma para realizar a citocinese e fica cada vez menor à medida que a citocinese progride e se desmonta completamente uma vez que a célula tenha sido dividida em duas.

A divisão celular de muitas células animais é acompanhada por muitas mudanças na forma da célula e por um decréscimo na aderência da célula à suas vizinhas, a matriz extracelular, ou ambas. Essas mudanças resultam, em parte, da reorganização dos filamentos de actina e de miosina no córtex celular sendo uma delas a formação do anel contrátil. Fibroblastos de mamíferos em

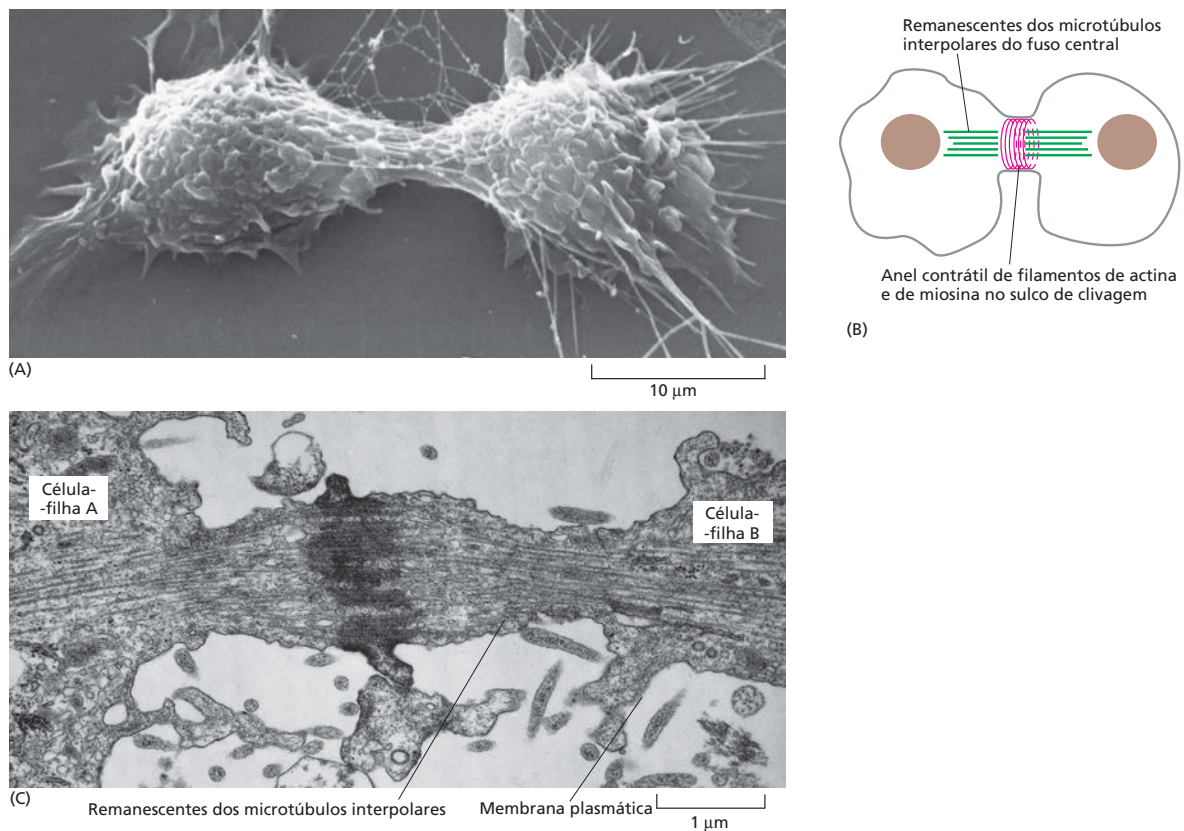



Figura 18-33 O anel contrátil divide a célula em duas. (A) Micrografia eletrônica de varredura de uma célula animal em cultura nos estágios finais da citocinese. (B) Diagrama esquemático da região central de uma célula similar mostrando o anel contrátil abaixo da membrana plasmática e o que restou dos dois grupos de microtúbulos interpolares. (C) Micrografia eletrônica convencional da célula animal em divisão. A clivagem está quase completa, mas as células-filhas permanecem unidas por uma fina extensão de citoplasma contendo o restante dos microtúbulos interpolares do fuso mitótico central, que se sobrepõem. (A, cortesia de Guenter Albrecht-Bueler; C, cortesia de J.M. Mullins.)

cultura, por exemplo, espalham-se achatados durante a interfase, como resultado dos contatos adesivos fortes que os fibroblastos fazem com a superfície sobre a qual estão crescendo – denominada substrato. Entretanto, quando as células entram na fase M, elas se tornam arredondadas. Em parte, as células alteram a forma, porque algumas proteínas da membrana plasmática, responsáveis pela ligação das células ao substrato – as *integrinas* (discutidas no Capítulo 20) –, tornam-se fosforiladas e perdem sua capacidade de adesão. Uma vez finalizada a citocinese, as células-filhas restabelecem seu contato forte com o substrato e achatam novamente (**Figura 18-34**). Quando as células dividem em um tecido animal, esse ciclo de adesão e dissociação provavelmente permite que as células rearranjem seus contatos com as células vizinhas e com a matriz extracelular, de modo que as novas células produzidas pela divisão celular possam se acomodar no tecido.

A citocinese nas células vegetais envolve a formação de uma nova parede celular

O mecanismo de citocinese em plantas superiores é muito diferente das células animais, provavelmente porque as células vegetais são circundadas por uma rígida parede celular (discutida no Capítulo 20). As duas células-filhas são separadas não pela ação do anel contrátil na superfície celular, mas pela formação de uma nova parede que se forma dentro da célula em divisão. O posicionamento dessa nova parede determina precisamente a posição das duas células-filhas em relação às células vizinhas. Assim, os planos de divisão celular, juntamente com o aumento da célula, determinam a forma final da planta.

A nova parede celular inicia sua formação no citoplasma entre os dois conjuntos de cromossomos segregados no início da telófase. O processo de formação é coordenado por uma estrutura denominada **fragmaplasto**, a qual é for-

Figura 18-34 As células animais mudam a forma durante a fase M. Nessas micrografias de culturas de fibroblastos de camundongos em divisão, a mesma célula foi fotografada em períodos sucessivos. Note como a célula fica arredondada quando entra em mitose; as duas células-filhas ficam achatadas novamente após o final da citocinese. (Cortesia de Guenter Albrecht-Buehler.)

mada pelos remanescentes dos microtúbulos interpolares no equador do antigo fuso mitótico. Pequenas vesículas circundadas por membrana, em sua maioria derivadas do aparelho de Golgi e preenchidas com polissacarídeos e glicoproteínas necessárias para a matriz da parede celular, são transportadas, juntamente com os microtúbulos, para o fragmaplasto. Ali, elas se fundem para formar uma estrutura em forma de disco, circundada por uma membrana, a qual se expande com a fusão de mais vesículas até que atinja a membrana plasmática e a parede celular original e divida a célula em duas (**Figura 18-35**). Posteriormente, as microfibrilas de celulose são depositadas na matriz para completar a construção da nova parede celular.

Organelas circundadas por membranas devem ser distribuídas para as células-filhas quando uma célula se divide

Organelas, como as mitocôndrias e os cloroplastos, não podem formar-se espontaneamente a partir de cada um de seus componentes; elas surgem so-

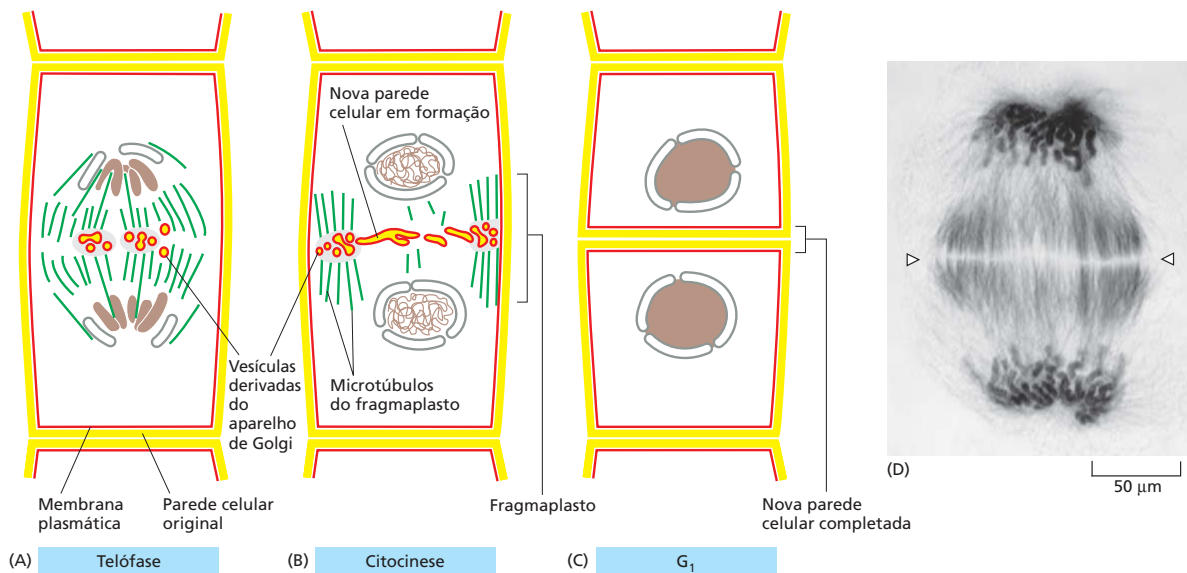



Figura 18-35 A citocinese em uma célula vegetal é organizada por uma estrutura com base em microtúbulos denominada fragmaplasto. No início da telófase, após a segregação dos cromossomos-filhos, uma nova parede celular inicia sua reestruturação dentro da célula no equador do antigo fuso (A). Os microtúbulos interpolares do fuso mitótico remanescente na telófase formam o *fragmaplasto* e orientam as vesículas para o equador do fuso. Ali, as vesículas circundadas por membranas, derivadas do aparelho de Golgi e que estão preenchidas com material da parede celular, fusionam para formar a nova parede celular (B), que cresce para a periferia até alcançar a membrana plasmática da parede celular original. A membrana plasmática e a membrana que circunda a nova parede celular (ambas representadas em *vermelho*) fusionam, separando completamente as duas células-filhas (C). Uma micrografia óptica de uma célula vegetal em telófase é mostrada em (D) no estágio correspondente ao (A). A célula foi corada para mostrar tanto os microtúbulos como os dois conjuntos de cromossomos-filhos segregados nos dois polos do fuso. A localização da nova parede celular em crescimento está indicada pelas setas. (D, cortesia de Andrew Bajer.)

mente do crescimento e da divisão das organelas preexistentes. Igualmente, as células não podem produzir novo retículo endoplasmático (RE) ou aparelho de Golgi, a não ser que parte desses já esteja presente, que então pode crescer. Então, como as diversas organelas circundadas por membrana segregam quando a célula se divide de modo que cada filha receba algumas?

Organelas como mitocôndrias e cloroplastos, estão, em geral, presentes em grande número e serão facilmente herdadas se, em média, seu número simplesmente dobrar a cada ciclo celular. O RE das células interfásicas é contínuo com a membrana nuclear e é organizado pelos microtúbulos do citoesqueleto (ver Figura 17-18A). Quando a célula entra na fase M, a reorganização dos microtúbulos libera o RE; na maioria das células, o RE liberado permanece intacto durante a mitose e é cortado em dois durante a citocinese. O aparelho de Golgi se fragmenta durante a mitose; os fragmentos se associam aos microtúbulos do fuso por meio de proteínas motoras, passando para as células-filhas com o alongamento do fuso na anáfase. Outros componentes celulares, incluindo todas as proteínas solúveis, são herdados randomicamente quando a célula se divide.

Tendo discutido como as células se dividem, voltaremos agora para o problema geral de como o tamanho de um animal ou de um órgão é determinado, o que nos leva a considerar como o número e o tamanho das células são controlados.

QUESTÃO 18-8

Desenhe um esquema detalhado da formação da nova parede celular que separa duas células-filhas quando uma célula vegetal se divide (ver Figura 18-35). Em particular, mostre onde as proteínas da membrana das vesículas derivadas do aparelho de Golgi irão se localizar, indicando o que acontece com a parte da proteína na membrana da vesícula de Golgi que está exposta para o interior da vesícula de Golgi. (Verifique o Capítulo 11 se você precisar lembrar a estrutura da membrana.)

CONTROLE DO NÚMERO E DO TAMANHO DAS CÉLULAS

Um óvulo fertilizado de camundongo e um óvulo fertilizado humano são similares em tamanho, e mesmo assim um camundongo adulto é muito menor do que um humano adulto. Quais são as diferenças no controle do comportamento da célula em humanos e camundongos que geram essas diferenças no tamanho? A mesma pergunta fundamental pode ser feita sobre cada órgão e tecido no corpo de um indivíduo. Qual ajustamento do comportamento celular explica o comprimento da tromba de um elefante ou o tamanho do seu cérebro ou do seu fígado? Essas questões estão sem resposta, mas, no mínimo, é possível dizer quais devem ser os ingredientes de uma resposta. Três processos fundamentais determinam em grande parte o tamanho dos órgãos e do corpo: crescimento celular, divisão celular e morte celular. Cada um desses processos, por sua vez, depende de programas intrínsecos à célula individual e é regulado por sinais a partir de outras células no corpo.

Nesta seção, discutiremos primeiro como os organismos eliminam as células indesejadas por uma forma de morte celular programada, chamada de *apoptose*. Então, discutiremos como os sinais extracelulares estimulam a sobrevivência da célula, o crescimento celular e a divisão celular, e, assim, ajudam a controlar o tamanho de um animal e de seus órgãos. Concluiremos a seção com uma breve discussão sobre os sinais inibidores extracelulares que ajudam a manter esses processos sob controle.

A apoptose auxilia a regular o número de células animais

As células de um organismo multicelular são membros de uma comunidade altamente organizada. O número de células nessa comunidade é fortemente regulado – não apenas pelo controle da velocidade da divisão celular, mas também pelo controle de morte celular. Se as células não são mais necessárias, elas cometem suicídio pela ativação de um programa de morte intracelular – um processo chamado de **morte celular programada**. Nos animais, de longe, a forma mais comum de morte celular programada é chamada de **apoptose** (da palavra grega que significa "queda", como as folhas que caem da árvore).

QUESTÃO 18-9

Acredita-se que o aparelho de Golgi seja dividido para as células-filhas durante a divisão celular por uma distribuição randômica de fragmentos que são criados na mitose. Explique por que a divisão randômica dos cromossomos não funcionaria.

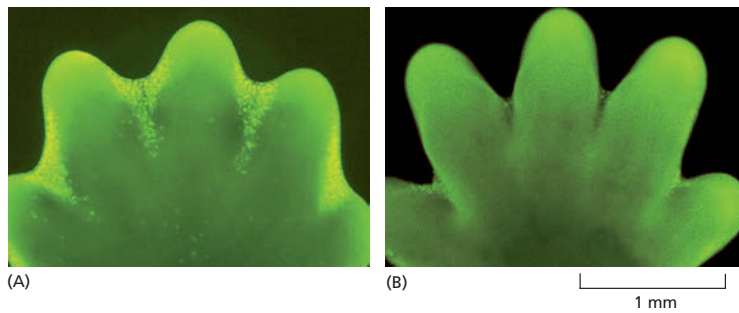



Figura 18-36 A apoptose nas patas de um camundongo em desenvolvimento "esculpe" os dedos. (A) A pata nesse embrião de camundongo foi tratada com um corante que marca especificamente células que sofreram apoptose. As células apoptóticas aparecem como pontos *verdes-claros* entre os dedos em desenvolvimento. (B) Essa morte de células elimina o tecido entre os dedos em desenvolvimento, como visto na pata mostrada um dia mais tarde. Aqui, poucas, ou nenhuma, células apoptóticas podem ser visualizadas. (De W. Wood *et al.*, *Development* 127:5245-5252, 2000. Com permissão de The Company of Biologists Ltd.)

A quantidade de apoptose que ocorre tanto em tecidos adultos como nos em desenvolvimento pode ser impressionante. No desenvolvimento do sistema nervoso de vertebrados, por exemplo, mais da metade das células nervosas produzidas normalmente morrem logo depois da sua formação. Em um humano adulto saudável, bilhões de células morrem na medula óssea e no intestino a cada hora. Parece um grande desperdício tantas células morrerem, especialmente porque uma vasta maioria é perfeitamente saudável no momento em que elas se suicidam. Para quais propósitos serve essa morte celular massiva?

Em alguns casos, as respostas são claras. Patas de camundongos – e nossas próprias mãos e pés – são esculpidas pela apoptose durante o desenvolvimento embrionário: elas começam como estruturas em forma de pá, e os dedos individuais das mãos e dos pés se separam apenas quando as células entre eles morrem (**Figura 18-36**). Em outros casos, as células morrem quando a estrutura que elas formam não é mais necessária. Quando um girino muda para um sapo na metamorfose, as células na cauda morrem, e a cauda que não é necessária para o sapo desaparece (**Figura 18-37**). Nesses casos, as células desnecessárias morrem por apoptose.

Em tecidos adultos, a morte celular faz o balanço exato da divisão celular, a não ser que o tecido estivesse crescendo ou se encolhendo. Se uma parte do fígado é removida em um rato adulto, por exemplo, as células do fígado se proliferam para compensar a perda. De modo oposto, se um rato é tratado com fenobarbital, que estimula a divisão celular do fígado, o fígado aumenta. Entretanto, quando o tratamento com fenobarbital para, a apoptose no fígado aumenta muito até que o órgão tenha voltado ao tamanho original, normalmente dentro de uma semana. Assim, o fígado é mantido com um tamanho constante pela regulação tanto da taxa de morte celular como da taxa de nascimento celular.

A apoptose é mediada por uma cascata proteolítica intracelular

Células que morrem, como resultado de uma doença aguda, em geral incham e arrebentam, derramando todo o seu conteúdo sobre as suas vizinhas, um pro-

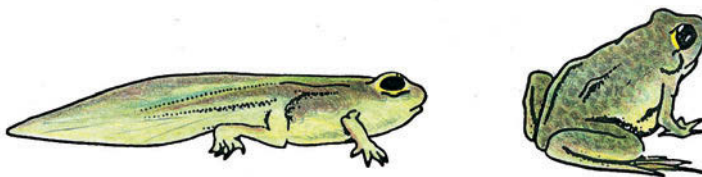



Figura 18-37 Durante a metamorfose de um girino em um sapo, as células na sua cauda são induzidas a sofrer apoptose. Todas as alterações que ocorrem durante a metamorfose, incluindo a indução da apoptose na cauda do girino, são estimuladas por um aumento no hormônio tireoidiano no sangue.

cesso chamado de *necrose celular* (**Figura 18-38A**). Essa erupção aciona uma resposta inflamatória potentemente danosa. Em contraste, uma célula que sofre apoptose morre de modo limpo, sem danificar as suas vizinhas. Uma célula em apoptose se enruga e condensa (Figura 18-38B). O citoesqueleto colapsa, o envelope nuclear se desmonta, e o DNA do núcleo se quebra em fragmentos (**Animação 18.7**). O mais importante, a superfície da célula é alterada de tal modo que ela imediatamente atrai células fagocíticas, em geral células fagocíticas especializadas chamadas de macrófagos (ver Figura 15-32B). Essas células engolfam a célula em apoptose antes que ela derrame o seu conteúdo (Figura 18-38C). Essa remoção rápida da célula morrendo evita as consequências danosas da necrose celular e também permite que os componentes orgânicos da célula em apoptose sejam reciclados pela célula que a ingere.

QUESTÃO 18-10

Por que você acha que a apoptose ocorre por um mecanismo diferente daquele da morte celular que ocorre na necrose celular? Quais poderiam ser as consequências se a apoptose não fosse realizada dessa forma tão limpa e ordenada, por meio da qual a célula se destrói por dentro e evita o escape do seu conteúdo para o espaço extracelular?

A maquinaria responsável pela apoptose parece ser similar em todas as células animais. Ela envolve a família **caspase** de proteases. As caspases são produzidas como precursores inativos chamados de *pró-caspases.* As pró-caspases são normalmente ativadas por clivagem proteolítica em resposta a sinais que induzem a apoptose. As caspases ativadas clivam e assim ativam outros membros da família das pró-caspases, resultando em uma cascata proteolítica cada vez maior (**Figura 18-39**). Elas também clivam outras proteínas-chave na célula. Uma das caspases, por exemplo, cliva as proteínas lamina, que formam a lâmina nuclear subjacente ao envelope nuclear. Essa clivagem causa a quebra irreversível da lâmina nuclear (ver Figura 18-31). Dessa forma, a célula se desmantela rapidamente e de forma limpa, e seu cadáver é rapidamente capturado e digerido por outra célula.

A ativação do programa de apoptose, como a entrada em um novo estágio do ciclo celular, é normalmente acionada de uma maneira tudo-ou-nada. A cascata proteolítica não é apenas destrutiva e autoestimulada, mas também irreversível. Uma vez que a célula alcançou um ponto crítico ao longo do caminho para a destruição, ela não pode voltar atrás. Assim, é importante que a decisão para morrer seja fortemente controlada.

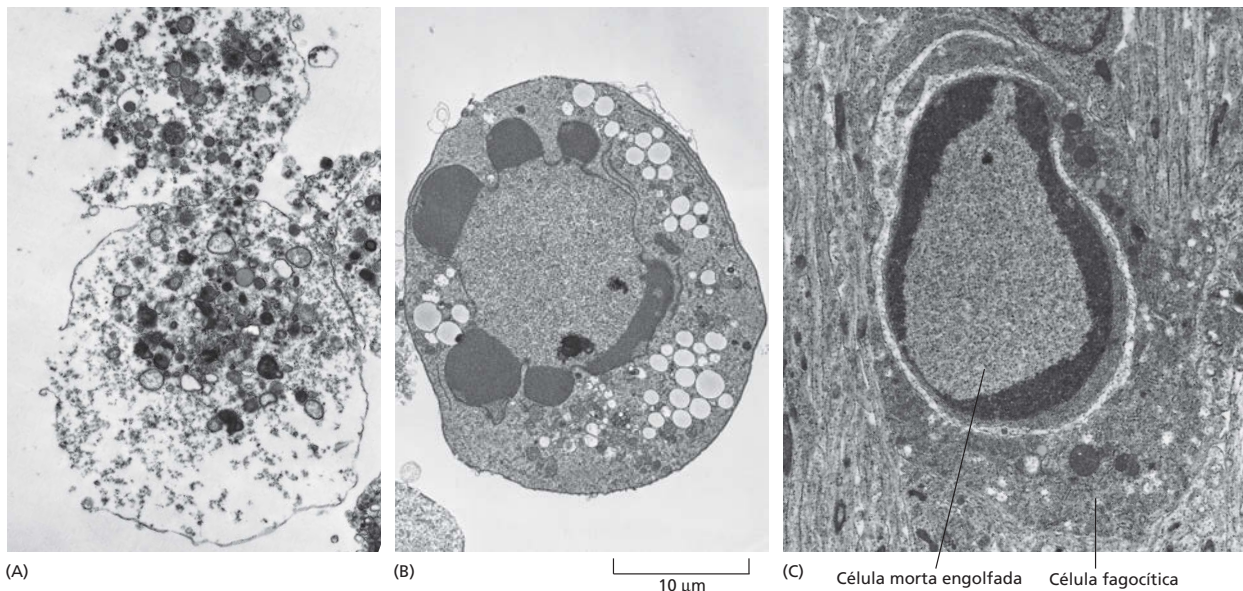



Figura 18-38 As células que sofrem apoptose morrem de forma rápida e limpa. Micrografias eletrônicas mostrando células que morreram por necrose (A) ou por apoptose (B e C). As células em (A) e em (B) morreram em uma placa de cultura, e a célula em (C) morreu em um tecido em desenvolvimento e foi engolfada por uma célula fagocítica. Note que a célula em (A) parece ter explodido, e aquelas em (B) e (C) se condensaram, mas parecem relativamente intactas. Os grandes vacúolos vistos no citoplasma da célula em (B) são uma característica variável da apoptose. (Cortesia de Julia Burne.)

Figura 18-39 **A apoptose é mediada por uma cascata proteolítica intracelular.** (A) Cada protease suicida (caspase) é produzida como uma pró-enzima inativa, uma pró-caspase, que é ativada pela clivagem proteolítica por outro membro da mesma família de proteases: dois fragmentos clivados a partir de cada uma das duas moléculas de pró-caspases se associam para formar uma caspase ativa, que é formada de duas subunidades pequenas e de duas grandes. Os dois pró-domínios normalmente são descartados. (B) Cada molécula de caspase ativada pode então clivar várias moléculas de pró-caspases, ativando-as através disso, e essas podem então ativar até mais moléculas de pró-caspases. Dessa forma, uma ativação inicial de um pequeno número de moléculas de proteases pode conduzir, via uma reação de amplificação em cadeia (uma cascata), para uma ativação explosiva de um grande número de moléculas de proteases. Algumas das caspases ativadas quebram então inúmeras proteínas-chave na célula, como as laminas nucleares, levando à morte controlada da célula.

O programa de morte é regulado pela família Bcl2 de proteínas intracelulares

Todas as células animais nucleadas contêm as sementes da sua própria destruição: nessas células, as pró-caspases inativas ficam esperando por um sinal para destruir a célula. Por isso, não é surpreendente que a atividade das caspases seja fortemente regulada dentro da célula para assegurar que o programa de morte seja reprimido até que seja necessário.

As principais proteínas que regulam a ativação das pró-caspases são membros da **família das Bcl2** de proteínas intracelulares. Alguns membros dessa família de proteínas promovem a ativação da pró-caspase e da morte celular, e outras inibem esses processos. Dois dos membros mais importantes da família promotora da morte são as proteínas chamadas de *Bax* e *Bak.* Essas proteínas ativam as pró-caspases indiretamente, pela indução da liberação do citocromo *c* a partir das mitocôndrias para o citosol. O citocromo *c* promove a montagem de uma grande estrutura de sete braços semelhante a um catavento que recruta moléculas de pró-caspases específicas, formando um complexo proteico chamado de *apoptossomo*. As moléculas de caspases se tornam ativadas dentro do apoptossomo, acionando uma cascata da caspase que conduz à apoptose (Figura 18-40). As proteínas Bax e Bak são ativadas por outros membros da família Bcl2 promotores da morte, que são produzidos ou ativados por várias lesões à célula, como o dano no DNA.

Outros membros da família Bcl2, incluindo a própria Bcl2, atuam para inibir a ativação da pró-caspase e da apoptose, em vez de promovê-las. Uma maneira delas o fazerem é bloqueando a capacidade de Bax e Bak de liberar citocromo *c* a partir das mitocôndrias. Alguns dos membros da família Bcl2 que promovem a apoptose, incluindo a proteína denominada Bad, assim o fazem se ligando e bloqueando a atividade de Bcl2 e outros membros da família Bcl2, supressores da morte (ver Figura 16-34). O equilíbrio entre as atividades dos membros da família Bcl2 pró-apoptóticos e antiapoptóticos determinam se uma célula de mamífero morre ou vive pela apoptose.

O programa de morte intracelular também é regulado por sinais a partir de outras células, que podem ou ativar ou suprimir o programa. A sobrevivência das células, a divisão celular e o crescimento celular são todos regulados por sinais extracelulares, que juntos ajudam os organismos multicelulares a controlar o número de células e o tamanho das células, como discutiremos a seguir.

Figura 18-40 Bax e Bak são membros da família das Bcl2 de proteínas intracelulares promotoras da morte que podem acionar a apoptose pela liberação do citocromo *c* da mitocôndria. Quando Bak ou Bax é ativada por um estímulo apoptótico, ela se agrega na membrana mitocondrial externa, levando à liberação do citocromo *c* por um mecanismo desconhecido. O citocromo *c* é liberado para dentro do citosol no espaço intermembranas da mitocôndria (junto com outras proteínas nesse espaço – não mostrado). O citocromo *c* então se liga a uma proteína adaptadora, fazendo com que ela se monte em um complexo de sete braços. Esse complexo então recruta sete moléculas de uma pró-caspase específica (chamada de pró-caspase-9) para formar uma estrutura chamada de apoptossomo. As proteínas pró-caspase-9 se tornam ativadas dentro do apoptossomo e agora ativam diferentes pró-caspases no citosol, levando à cascata da caspase e apoptose.

Células animais requerem sinais extracelulares para sobreviver, crescer e dividir-se

Organismos unicelulares, como as bactérias e as leveduras, tendem a crescer e a se dividir tão rápido quanto conseguem, e a sua taxa de proliferação depende muito da disponibilidade de nutrientes no meio. As células em um organismo multicelular, ao contrário, são controladas de modo que uma célula individual sobreviva apenas quando for necessária e se divida apenas quando outra célula é necessária, ou para permitir o crescimento do tecido ou para repor a perda de células. As células devem crescer antes de se dividir para que um tecido cresça ou para que ocorra substituição celular. Assim, para que um animal sobreviva, cresça ou se divida, apenas a presença de nutrientes não é suficiente. A célula também deve receber sinais químicos a partir de outras células, normalmente suas vizinhas.

A maioria das moléculas de sinalização extracelulares que influencia a sobrevivência celular, o crescimento celular e a divisão celular são proteínas solúveis secretadas por outras células ou proteínas ligadas à superfície de outras células ou da matriz extracelular. Embora a maioria atue positivamente para estimular um ou mais desses processos celulares, algumas atuam negativamente para inibir um determinado processo. As proteínas-sinal que atuam positivamente podem ser classificadas, com base na sua função, em três categorias principais:

1. **Fatores de sobrevivência** promovem a sobrevivência da célula pela supressão da apoptose.
2. **Mitógenos** estimulam a divisão celular, principalmente pela superação dos mecanismos de freio intracelulares que tendem a bloquear o avanço pelo ciclo celular.
3. **Fatores de crescimento** estimulam o crescimento celular (um aumento no tamanho da célula e na massa) pela promoção da síntese e pela inibição da degradação das proteínas e de outras macromoléculas.

Essas categorias não são mutuamente exclusivas, já que várias moléculas de sinalização têm mais do que uma dessas funções. O termo "fator de crescimento" é frequentemente utilizado como uma expressão geral para descrever uma pro-

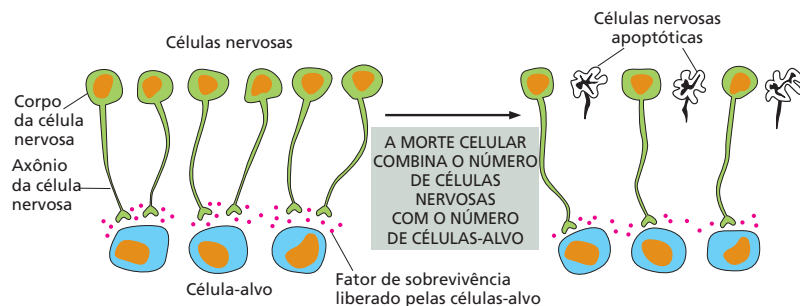



Figura 18-41 A morte celular ajuda a ajustar o número de células nervosas em desenvolvimento com o número de células-alvo com as quais elas fazem contato. São produzidas mais células nervosas do que podem ser suportadas pela quantidade limitante de fatores de sobrevivência liberados pelas células-alvo. Por isso, algumas células recebem quantidades insuficientes de fatores de sobrevivência para manter seu programa de suicídio reprimido e, como consequência, sofrer apoptose. Essa estratégia de superprodução seguida de seleção assegura que todas as células-alvo estejam conectadas por células nervosas e que as células nervosas "extras" sejam automaticamente eliminadas.

teína com qualquer um desses papéis. Na verdade, a frase "crescimento celular" é com frequência utilizada incorretamente para significar um aumento no número de células, que é mais corretamente chamado de "proliferação celular".

Nas próximas seções, examinaremos cada um desses tipos de moléculas de sinalização por vez.

As células animais necessitam de fatores de sobrevivência para evitar a apoptose

As células animais necessitam de sinais de outras células para sobreviver. Se privadas de tais fatores de sobrevivência, as células ativam seu programa de suicídio intracelular e morrem por apoptose. Essa necessidade por sinais a partir de outras células para a sobrevivência ajuda a assegurar que as células sobrevivam apenas quando e onde elas forem necessárias. As células nervosas, por exemplo, são produzidas em excesso no sistema nervoso em desenvolvimento e então competem por quantidades limitadas de fatores de sobrevivência que são secretados pelas células-alvo com as quais elas fazem contato. As células nervosas que recebem fatores de sobrevivência suficientes vivem, ao passo que as outras morrem por apoptose. Dessa forma, o número de células nervosas que sobrevivem é automaticamente ajustado de modo que seja apropriado para o número de células com as quais elas conectam (**Figura 18-41**). Acredita-se que uma dependência semelhante por sinais de sobrevivência, a partir de células vizinhas, controle os números de células em outros tecidos, tanto durante o desenvolvimento como na vida adulta.

Fatores de sobrevivência normalmente atuam pela ligação a receptores da superfície celular. Esses receptores ativados então ativam as vias de sinalização intracelulares que mantêm o programa de morte reprimido, em geral pela regulação dos membros da família Bcl2 de proteínas. Alguns fatores de sobrevivência, por exemplo, aumentam a produção de Bcl2, uma proteína que suprime a apoptose (**Figura 18-42**).

Mitógenos estimulam a divisão celular

A maioria dos mitógenos são proteínas de sinalização secretadas que se ligam à superfície celular de receptores. Quando ativados pela ligação do mitógeno,

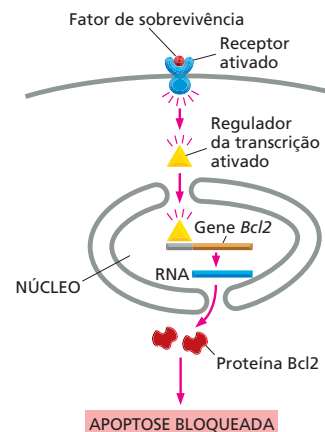



Figura 18-42 Fatores de sobrevivência muitas vezes suprimem a apoptose pela regulação dos membros da família das Bcl2. Neste caso, o receptor ativado ativa um regulador da transcrição no citosol. Essa proteína se move para o núcleo, onde ela ativa o gene que codifica para Bcl2, uma proteína que inibe a apoptose.

esses receptores ativam várias vias de sinalização intracelular (discutido no Capítulo 16) que estimulam a divisão celular. Essas vias de sinalização atuam principalmente pela liberação de moléculas-freio intracelulares que bloqueiam a transição da fase G_1 do ciclo celular para a fase S.

Um exemplo importante de uma dessas moléculas-freio é a *proteína Retinoblastoma (Rb),* primeiro identificada por estudos de um tumor raro de olhos em crianças, chamado de retinoblastoma, no qual a proteína Rb não existe ou é defectiva. A proteína Rb é abundante no núcleo de todas as células de vertebrados. Ela se liga a determinados reguladores da transcrição, prevenindo que elas estimulem a transcrição dos genes necessários para a proliferação celular. Os mitógenos liberam o freio Rb da seguinte maneira. Eles ativam vias de sinalização intracelular que conduzem para a ativação dos complexos G_1-Cdk e G_1/S-Cdk, discutidos anteriormente. Esses complexos fosforilam a proteína Rb, alterando a sua conformação de modo que ela libere seus reguladores da transcrição, que então estão livres para ativar os genes necessários para a proliferação celular (**Figura 18-43**).

A maioria dos mitógenos foi identificada e caracterizada por seus efeitos em células em cultura (**Figura 18-44**). Um dos primeiros mitógenos identificados dessa forma foi o fator de *crescimento derivado de plaquetas,* ou *PDGF* (*platelet-derived growth factor*), cujos efeitos são típicos de vários outros descobertos desde então. Quando coágulos de sangue se formam (em uma ferida, por exemplo), as plaquetas do sangue incorporadas ao coágulo são acionadas para liberar PDGF. Esse então se liga ao receptor tirosina-cinase (discutido no Capítulo 16)

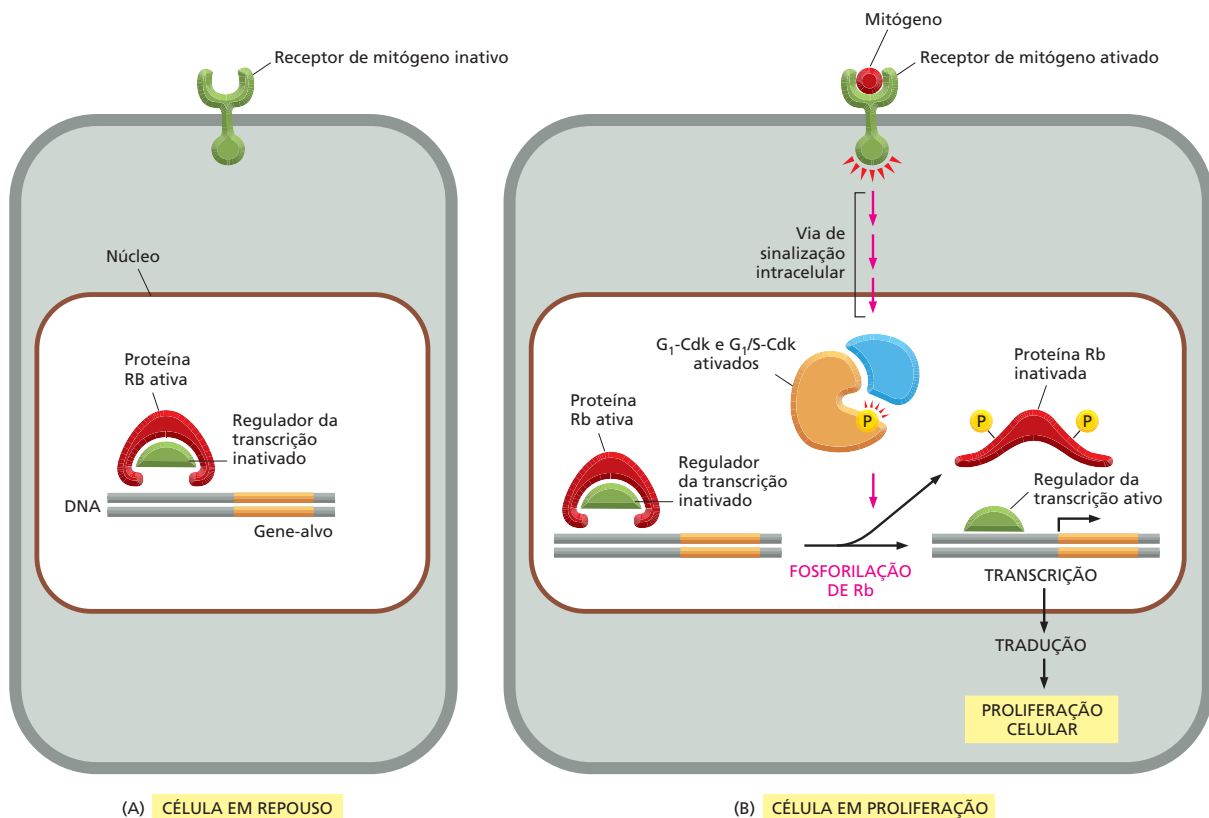



Figura 18-43 Um modo de como os mitógenos estimulam a proliferação celular é pela inibição da proteína Rb. (A) Na ausência dos mitógenos, a proteína Rb desfosforilada mantêm reguladores específicos da transcrição em um estado inativo; esses reguladores da transcrição são necessários para estimular a transcrição de genes-alvo que codificam para proteínas necessárias para a proliferação celular. (B) Mitógenos se ligam aos receptores da superfície celular e ativam vias de sinalização intracelular que levam à formação e à ativação dos complexos G_1-Cdk e G_1/S-Cdk. Esses complexos fosforilam e, assim, inativam a proteína Rb. As proteínas reguladoras de genes estão agora livres para ativar a transcrição dos seus genes-alvo, levando à proliferação celular.

Figura 18-44 **Fibroblastos de rato proliferam em resposta a fatores de crescimento e mitógenos.** As células nesta micrografia eletrônica de varredura são cultivadas na presença de soro bovino, que contém fatores de crescimento e mitógenos que estimulam as células a crescer e a se multiplicar. As células esféricas na parte de baixo da micrografia se arredondaram para se preparar para a divisão celular (ver Figura 18-34). (Cortesia de Guenter Albrecht-Buehler.)

nas células sobreviventes no local da ferida, estimulando-as, com isso, a proliferar e auxiliar na cicatrização da ferida. Similarmente, se parte do fígado é perdida por uma cirurgia ou lesão aguda, as células no fígado e em qualquer outro lugar produzem uma proteína chamada de *fator de crescimento de hepatócitos,* que auxilia a estimular as células sobreviventes do fígado a proliferar.

Fatores de crescimento extracelulares estimulam as células a crescer

O crescimento de um organismo ou órgão depende tanto do crescimento celular como da divisão celular. Se as células se dividirem sem crescer, elas ficarão progressivamente menores, e não haverá um aumento total na massa celular. Em organismos unicelulares como as leveduras, o crescimento celular (como a divisão celular) requer apenas nutrientes. Nos animais, ao contrário, tanto o crescimento celular como a divisão celular dependem de sinais a partir de outras células. Entretanto, o crescimento celular, diferente da divisão celular, não depende do sistema de controle do ciclo celular, tanto em leveduras como em células animais. Várias células animais, incluindo as células nervosas e a maioria das células musculares, realizam a maior parte do seu crescimento depois de terem-se tornado especializadas e parado de se dividir permanentemente.

Como a maioria dos fatores de sobrevivência e mitógenos, grande parte dos fatores de crescimento extracelulares se liga aos receptores da superfície celular, que ativam várias vias de sinalização intracelular. Essas vias levam ao acúmulo de proteínas e outras macromoléculas, e isso ocorre tanto pelo aumento da taxa de síntese dessas moléculas como pela diminuição da sua taxa de degradação (**Figura 18-45**). Algumas proteínas extracelulares de sinalização, incluindo PDGF, podem atuar tanto como fatores de crescimento como mitógenos, estimulando tanto o crescimento celular como o avanço pelo ciclo celular. Essas proteínas auxiliam a assegurar que as células mantenham o seu tamanho apropriado à medida que proliferam.

Comparado à divisão celular, existem surpreendentemente poucos estudos de como o tamanho da célula é controlado nos animais. Como resultado, permanece um mistério como diferentes tipos de células em um mesmo animal crescem para serem tão diferentes em tamanho (**Figura 18-46**).

Algumas proteínas-sinal extracelulares inibem a sobrevivência da célula, a divisão ou o crescimento

As proteínas-sinal extracelulares que discutimos até agora – fatores de sobrevivência, mitógenos e fatores de crescimento – atuam positivamente para aumentar o tamanho de órgãos e organismos. No entanto, algumas proteínas-sinal extracelulares atuam para opor esses reguladores positivos e assim inibem o crescimento do tecido. A *miostatina*, por exemplo, é uma proteína-sinal secretada que normalmente inibe o crescimento e a proliferação dos mioblastos que se fundem para formar as células musculares esqueléticas durante o desenvolvimento dos mamíferos. Quando o gene que codifica para miostatina é eliminado em camundongos, os seus músculos crescem para serem várias vezes maiores do que o normal, pois tanto o número quanto o tamanho das células musculares está aumentado. Notavelmente, duas raças bovinas que foram cruzadas para

Figura 18-45 **Fatores de crescimento extracelulares aumentam a síntese e diminuem a degradação de macromoléculas.** Isso conduz a um aumento líquido das macromoléculas e, por sua vez, de todo o crescimento (ver também Figura 16-35).

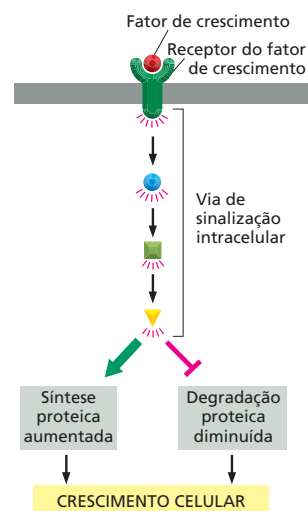
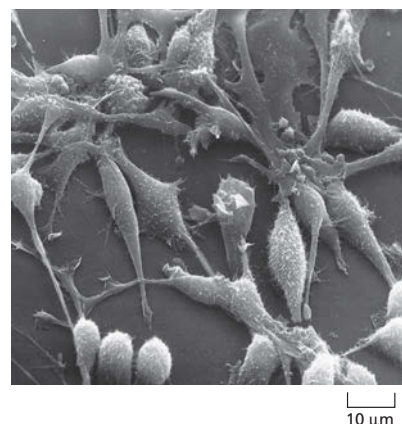
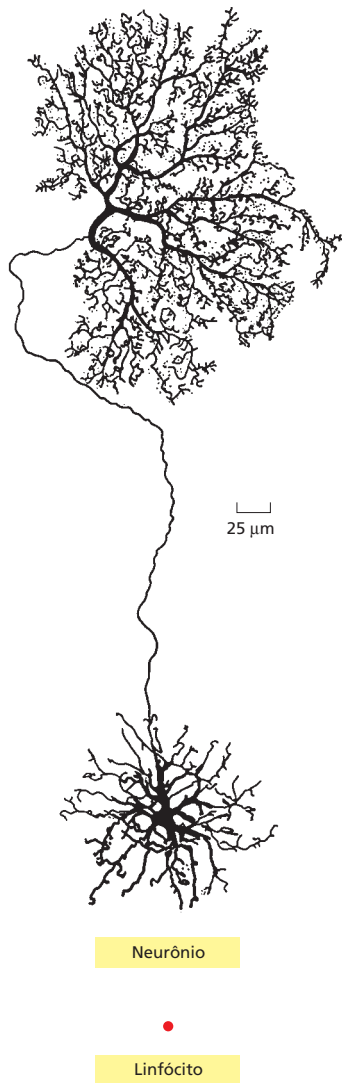



Figura 18-46 Uma célula nervosa e um linfócito são muito diferentes em tamanho. Esses dois tipos de células, que estão desenhados na mesma escala, provêm da mesma espécie de macaco e contêm a mesma quantidade de DNA. Um neurônio cresce de forma progressiva depois que parou permanentemente de dividir-se. Durante esse tempo, a proporção entre citoplasma e DNA aumenta muito – por um fator de mais de 10^5 para alguns neurônios. (Neurônio de B.B. Boycott em Essays on the Nervous System [R. Bellairs e E. G. Gray, eds.]. Oxford, U.K.: Clarendon Press, 1974.Com permissão de Oxford University Press.)

terem músculos exacerbados apresentaram mutações no gene que codifica para miostatina (**Figura 18-47**).

Como discutiremos no último capítulo, os cânceres são similares aos produtos de mutações que deixam as células livres dos controles "sociais" normais que atuam na sobrevivência, no crescimento e na proliferação celular. Como as células cancerosas são geralmente menos dependentes de sinais de outras células do que as células normais, elas podem sobreviver por mais tempo, crescer mais e dividir-se mais do que as suas vizinhas normais, produzindo tumores que podem matar seu hospedeiro.

Neste capítulo, quando discutimos a divisão celular, sempre estávamos nos referindo àquelas divisões ordinárias que produzem duas células-filhas, cada uma com um complemento completo e idêntico do material genético da célula parental. Entretanto, existe um tipo de divisão celular diferente e altamente especializado chamado de *meiose*, que é necessário para a reprodução sexual nos eucariotos. No próximo capítulo, descreveremos as características especiais da meiose e como ela dá suporte aos princípios genéticos que definem as leis da hereditariedade.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- **O ciclo celular eucariótico consiste em várias fases distintas. Essas incluem a fase S, durante a qual o DNA do núcleo é replicado, e a fase M, durante a qual o núcleo se divide (mitose) e depois o citoplasma se divide (citocinese).**
- **Na maioria das células, existem uma fase de intervalo (G_1) depois da fase M e antes da fase S e uma outra (G_2) depois da fase S e antes da fase M. Esses intervalos dão à célula mais tempo para crescer e se preparar para os eventos da fase S e da fase M.**

Figura 18-47 Mutação do gene de *miostatina* leva a um aumento dramático na massa muscular. Esse Belgium Blue foi produzido por criadores de gado, e apenas recentemente foi observado que ele possui uma mutação no gene da *Miostatina*. Camundongos, propositadamente, deficientes no mesmo gene também apresentaram, de forma notável, músculos exacerbados. (De H.L. Sweeney, *Sci. Am.* 291:62-69, 2004. Com permissão de Scientific American.)

- O sistema de controle do ciclo celular coordena os eventos do ciclo celular, ativando, de forma cíclica, as partes apropriadas da maquinaria do ciclo celular e então desativando-as.
- O sistema de controle depende de um grupo de proteína-cinases, cada uma composta de uma subunidade reguladora chamada de ciclina e de uma subunidade catalítica chamada de proteína-cinase dependente de ciclina (Cdk).
- As concentrações de ciclina aumentam e diminuem em momentos específicos no ciclo celular, auxiliando a acionar eventos do ciclo. As Cdks são ativadas ciclicamente tanto pela ligação da ciclina como pela fosforilação de alguns aminoácidos e pela desfosforilação de outros; quando ativadas, as Cdks fosforilam proteínas-chave na célula.
- Diferentes complexos ciclina-Cdk acionam diferentes etapas do ciclo celular: M-Cdk conduz a célula para mitose; G_1-Cdk a conduz por G_1; G_1/S-Cdk e S-Cdk conduzem para a fase S.
- O sistema de controle também utiliza complexos proteicos que acionam a proteólise de reguladores específicos do ciclo celular em determinados estágios do ciclo.
- O sistema de controle do ciclo celular pode parar o ciclo em pontos de verificação específicos para assegurar que as condições intra e extracelulares sejam favoráveis e que a próxima etapa no ciclo não comece antes que a anterior tenha terminado. Alguns desses pontos de verificação se baseiam nos inibidores de Cdk que bloqueiam a atividade de um ou mais complexos ciclina-Cdk.
- A S-Cdk inicia a replicação do DNA durante a fase S e ajuda a assegurar que o genoma seja copiado apenas uma vez. Pontos de verificação em G_1, fase S e G_2 previnem que as células repliquem DNA danificado.
- M-Cdk orienta a célula para mitose com a montagem do fuso mitótico com base em microtúbulos, que moverá cromossomos-filhos para os polos opostos da célula.
- Os microtúbulos crescem para fora dos centrossomos duplicados, e alguns interagem com os microtúbulos que crescem a partir do polo oposto, formando os microtúbulos interpolares que formam o fuso.
- Centrossomos, as proteínas motoras associadas aos microtúbulos e os próprios cromossomos replicados trabalham juntos para montar o fuso.
- Quando o envelope nuclear é desfeito, os microtúbulos do fuso invadem a região nuclear e capturam os cromossomos replicados. Os microtúbulos se ligam a complexos proteicos denominados cinetocoro, associados ao centrômero de cada cromátide-irmã.
- Os microtúbulos dos polos opostos puxam em direção oposta cada cromossomo replicado, levando os cromossomos para o equador do fuso mitótico.
- A separação repentina das cromátides-irmãs permite que os cromossomos-filhos sejam puxados, pelo fuso, para os polos opostos. Os dois polos também se distanciam, separando ainda mais os dois conjuntos cromossômicos.
- O movimento dos cromossomos pelo fuso é dirigido tanto pelas proteínas motoras dos microtúbulos quanto pela polimerização e despolimerização dos microtúbulos.
- O envelope nuclear é reconstituído ao redor dos dois conjuntos de cromossomos segregados para formar os dois novos núcleos, completando, assim, a mitose.
- O aparelho de Golgi se dissocia em vários pequenos fragmentos durante a fase M, assegurando uma distribuição homogênea entre as células-filhas.

- Nas células animais, a divisão citoplasmática é mediada por um anel contrátil de filamentos de actina e miosina, os quais se reúnem no meio do caminho entre os polos do fuso e contraem para dividir o citoplasma em dois; nas células vegetais, ao contrário, a divisão celular ocorre pela formação de uma nova parede celular dentro da célula, a qual divide o citoplasma em dois.
- Os números de células animais são regulados por uma combinação de programas intracelulares e sinais extracelulares que controlam a sobrevivência celular, o crescimento celular e a proliferação celular.
- Várias células normais morrem por apoptose durante a vida de um animal pela ativação de um programa de suicídio interno que as mata.
- A apoptose depende de uma família de enzimas proteolíticas chamadas de caspases, que são produzidas como precursores inativos (pró-caspases). As pró-caspases são ativadas por clivagem proteolítica mediada por caspases.
- A maioria das células animais necessita de sinalização contínua a partir de outras células para evitar a apoptose. Esse pode ser um mecanismo para assegurar que as células sobrevivam apenas quando e onde forem necessárias.
- As células animais proliferam apenas quando estimuladas por mitógenos extracelulares produzidos por outras células, assegurando que a célula só se divida quando outra célula seja necessária. Os mitógenos ativam vias de sinalização intracelulares para ultrapassar os freios normais, que de outra forma bloqueiam a progressão do ciclo celular.
- Para que um organismo ou órgão cresça, as células devem crescer, assim como dividir-se. O crescimento das células animais depende de fatores de crescimento extracelulares, que estimulam a síntese proteica e inibem a degradação das proteínas.
- O tamanho da célula e do tecido também pode ser influenciado por proteínas de sinalização extracelulares inibidoras que se opõe aos reguladores positivos da sobrevivência celular, do crescimento celular e da divisão celular.
- As células cancerosas falham em obedecer a esses controles "sociais" normais no comportamento celular e, assim, crescem mais rápido, dividem-se mais, e vivem mais do que as suas vizinhas normais.

TERMOS-CHAVE

anáfase
apoptose
áster
biorientação
caspase
Cdk (proteína-cinase dependente de ciclina)
centrossomo
ciclina
ciclo celular
ciclo do centrossomo
citocinese
coesina
complexo de reconhecimento de origem (ORC)
complexo promotor da anáfase (APC)
condensação cromossômica
condensina
cinetocoro
cromátide-irmã
família Bcl2
fase G_1
fase G_2
fase M
fase S
fator de crescimento
fator de sobrevivência
fragmaplasto
fuso mitótico
G_1-Cdk
G_1-ciclina
G_1/S-Cdk
G_1/S-ciclina
interfase
M-Cdk
M-ciclina
metáfase
mitógeno
mitose
morte celular programada
polo do fuso
ponto de verificação
prófase
pró-metáfase
proteína inibidora de Cdk
S-Cdk
p53
S-ciclina
sistema de controle do ciclo celular
telófase

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 18-11

Aproximadamente, quanto tempo levaria para que um único óvulo humano fertilizado produzisse um grupo de células, por repetidas divisões, pesando 70 kg, se cada célula pesa 1 nanograma logo após cada divisão celular e se cada ciclo celular leva 24 horas? Por que leva mais tempo do que isso para produzir um homem adulto de 70 kg?

QUESTÃO 18-12

O ciclo celular mais curto de todas as células eucarióticas – ainda mais curto do que o de muitas bactérias – ocorre em muitos embriões animais jovens. Essas divisões de clivagem acontecem sem qualquer aumento significativo no peso do embrião. Como pode ser assim? Qual a fase do ciclo celular que você espera que seja mais reduzida?

QUESTÃO 18-13

Um dos importantes efeitos biológicos de uma alta dose de radiações ionizantes é parar a divisão celular.

A. Como isso ocorre?

B. O que acontece se uma célula tem uma mutação que previne que ela pare a divisão celular depois de ser irradiada?

C. Quais poderiam ser os efeitos de uma mutação dessas se a célula não for irradiada?

D. Um humano adulto que já atingiu a maturidade morrerá dentro de poucos dias depois de receber uma dose de radiação alta o bastante para parar a divisão celular. O que isso lhe diz (além de que se devem evitar altas doses de radiação)?

QUESTÃO 18-14

Se células são cultivadas em um meio de cultura contendo timidina radioativa, a timidina será covalentemente incorporada ao DNA das células durante a fase S. O DNA radioativo pode ser detectado no núcleo de células individuais por autorradiografia (isto é, colocando uma emulsão fotográfica sobre as células, as células radioativas ativarão a emulsão e se revelarão como pontos pretos quando observadas sob um microscópio). Considere um experimento simples no qual células são marcadas radioativamente por esse método apenas durante um curto período (cerca de 30 minutos). O meio com timidina radioativa é então substituído por um meio contendo timidina não marcada, e permite-se que as células cresçam durante mais algum tempo. Em diferentes pontos de tempo após a substituição do meio, as células são examinadas sob o microscópio. A fração de células em mitose (que pode ser facilmente reconhecida, pois as células se arredondaram e seus cromossomos estão condensados), que têm DNA radioativo no seu núcleo, é então determinada e representada em função do tempo depois da marcação com timidina radioativa (**Figura Q18-14**).

A. Todas as células (incluindo as células em todas as fases do ciclo celular) contêm DNA radioativo depois do procedimento de marcação?

B. Inicialmente não existem células mitóticas que contêm DNA radioativo (ver Figura Q18-14). Por que isso ocorre?

C. Explique o aumento e a diminuição e então o novo aumento da curva.

D. Estime o comprimento da fase G_2 a partir deste gráfico.

QUESTÃO 18-15

Uma das funções de M-Cdk é causar uma queda brusca na concentração de ciclina na metade do caminho para a fase M. Descreva as consequências dessa súbita diminuição e sugira possíveis mecanismos pelos quais isso pode ocorrer.

QUESTÃO 18-16

A Figura 18-5 mostra o aumento da concentração de ciclina e o aumento da atividade de Cdk nas células à medida que elas avançam pelo ciclo celular. É notável que a concentração de ciclina aumente de forma lenta e constante, ao passo que a atividade de M-Cdk aumenta bruscamente. Como você acha que essas diferenças surgiram?

QUESTÃO 18-17

Qual é a ordem na qual ocorrem os seguintes eventos durante a divisão celular:

A. anáfase

B. metáfase

C. pró-metáfase

D. telófase

E. fase lunar

F. mitose

G. prófase

Onde a citocinese se encaixa?

QUESTÃO 18-18

O tempo de vida de um microtúbulo nas células de mamíferos, entre sua formação pela polimerização e seu desaparecimento espontâneo pela despolimerização, varia com o estágio do ciclo celular. Uma célula em ativa proliferação possui tempo médio de 5 minutos na interfase e de 15 segundos na mitose. Se o tamanho médio de um microtúbulo na interfase é 20 μm, qual seria o tamanho durante a mitose, assumindo que as taxas de crescimento dos microtúbulos devido à adição de subunidades de tubulina nas duas fases são as mesmas?

QUESTÃO 19-19

Acredita-se que o equilíbrio entre as proteínas motoras direcionadas para a extremidade mais (+) e as direcionadas para a extremidade menos (-) que se ligam aos microtúbulos inter-

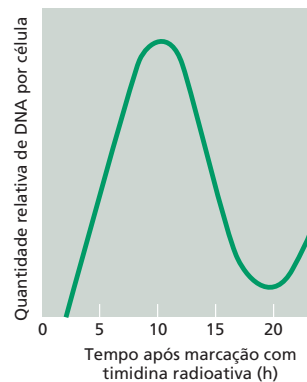



Figura Q18-14

polares na região de sobreposição do fuso mitótico auxilie na determinação do comprimento do fuso. Como que cada tipo de proteína motora contribui para a determinação do tamanho do fuso?

QUESTÃO 18-20

Faça um esquema dos principais estágios da mitose usando o Painel 18-1 (p. 626-627) como guia. Desenhe uma cromátide-irmã com uma cor e a siga através da mitose e da citocinese. Qual é o evento que compromete essa cromátide com uma célula-filha em particular? Uma vez comprometido, esse fenômeno pode ser revertido? O que pode influenciar esse comprometimento?

QUESTÃO 18-21

O movimento polar dos cromossomos durante a anáfase A está associado ao encurtamento dos microtúbulos. Em particular, os microtúbulos despolimerizam nas suas extremidades, as quais estão ligadas aos cinetocoros. Desenhe um modelo que explique como um microtúbulo pode encurtar e gerar força permanecendo firmemente ligado ao cromossomo.

QUESTÃO 18-22

Raramente, as duas cromátides-irmãs de um cromossomo replicado terminam em uma célula-filha. Como isso pode acontecer? Quais seriam as consequências de tais erros mitóticos?

QUESTÃO 18-23

Quais das seguintes afirmativas estão corretas? Explique suas respostas.

A. Os centrossomos são replicados antes que a fase M inicie.

B. Duas cromátides-irmãs surgem pela replicação do DNA do mesmo cromossomo e permanecem pareadas até alinharem-se na placa metafásica.

C. Os microtúbulos interpolares se ligam em suas extremidades e por isso são contínuos de um polo do fuso ao outro.

D. A polimerização e a despolimerização dos microtúbulos e as proteínas motoras dos microtúbulos são necessárias para a replicação do DNA.

E. Os microtúbulos se reúnem nos centrômeros e então se conectam aos cinetocoros, os quais são estruturas da região do centrossomo dos cromossomos.

QUESTÃO 18-24

Um anticorpo que se liga à miosina impede o movimento das moléculas de miosina ao longo dos filamentos de actina (a interação da actina e da miosina é descrita no Capítulo 17). Como você supõe que o anticorpo exerça esse efeito? Qual seria o resultado da injeção desse anticorpo nas células (A) no movimento dos cromossomos em anáfase ou (B) na citocinese. Explique suas respostas.

QUESTÃO 18-25

Observe com cuidado a micrografia eletrônica da Figura 18-38. Descreva as diferenças entre as células que morreram por necrose e as que morreram por apoptose. Como a fotografia confirma as diferenças entre os dois processos? Explique a sua resposta.

QUESTÃO 18-26

Quais das seguintes afirmações estão corretas? Explique as suas respostas.

A. As células não avançam de G_1 para a fase M do ciclo celular, a não ser que haja nutrientes suficientes para completar um ciclo celular inteiro.

B. A apoptose é mediada por proteases intracelulares especiais, uma das quais cliva laminas nucleares.

C. Neurônios em desenvolvimento competem por quantidades limitadas de fatores de sobrevivência.

D. Algumas proteínas do controle do ciclo celular de vertebrados funcionam quando expressadas em células de leveduras.

E. É possível estudar mutantes de leveduras que são defectivos em proteínas do controle do ciclo celular, apesar do fato de essas proteínas serem essenciais para que a célula viva.

F. A atividade enzimática de uma proteína Cdk é determinada tanto pela presença de uma ciclina ligada como pelo estado de fosforilação de Cdk.

QUESTÃO 18-27

Compare as regras do comportamento celular em um animal com as regras que governam o comportamento humano na sociedade. O que aconteceria a um animal se as suas células se comportassem como as pessoas normalmente se comportam na nossa sociedade? As regras que governam o comportamento celular poderiam ser aplicadas à sociedade humana?

QUESTÃO 18-28

No seu laboratório de pesquisa altamente classificado, o Dr. Lawrence M. é responsável pela tarefa de desenvolver uma cepa de ratos do tamanho de cães para ser colocada atrás de linhas inimigas. Em sua opinião, qual das seguintes estratégias o Dr. M. deveria seguir para aumentar o tamanho dos ratos?

A. Bloquear a apoptose.

B. Bloquear a função de p53.

C. Produzir em grandes quantidades os fatores de crescimento, os mitógenos ou os fatores de sobrevivência.

D. Obter uma licença para motorista de táxi e mudar de profissão.

Explique as possíveis consequências de cada opção.

QUESTÃO 18-29

PDGF é codificada por um gene que pode causar câncer quando expressado de maneira não apropriada. Por que os cânceres não surgem em lesões onde PDGF é liberado a partir de plaquetas?

QUESTÃO 18-30

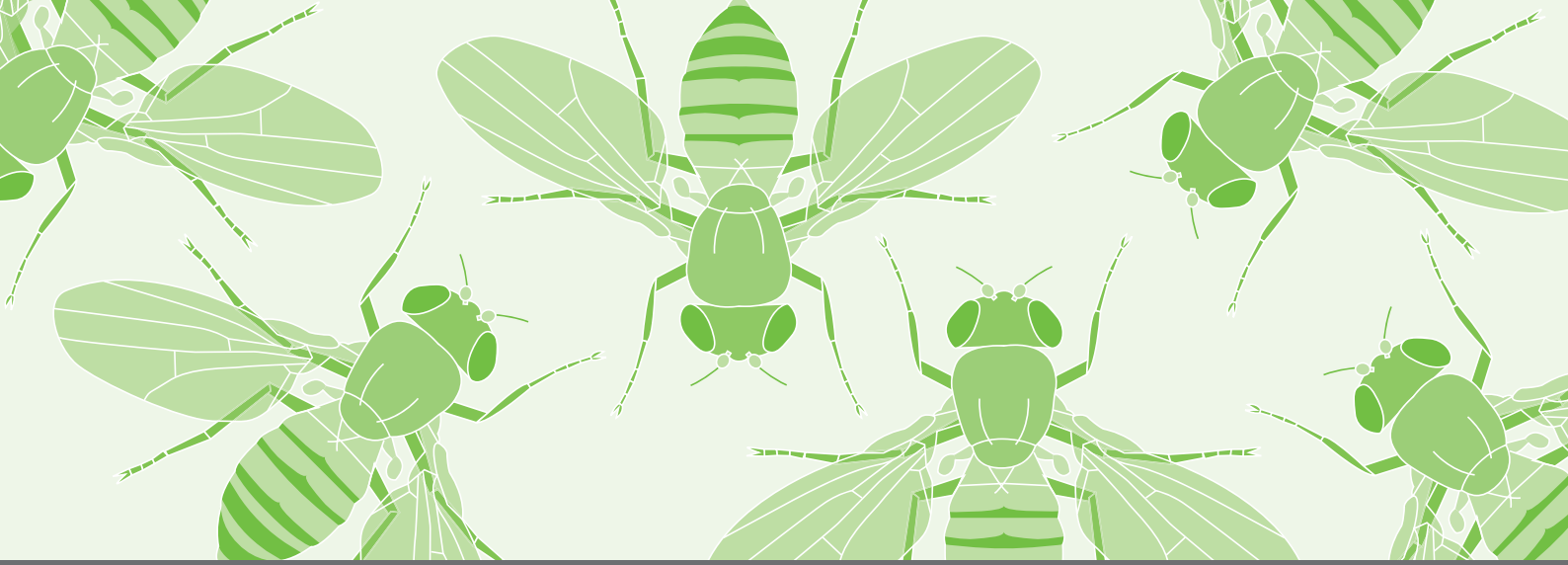
O que você supõe que ocorra em células mutantes que

A. não podem degradar M-ciclina?

B. sempre expressam altos níveis de p21?

C. não podem fosforilar Rb?

QUESTÃO 18-31

Células do fígado proliferam tanto em pacientes alcoólatras quanto em pacientes com tumores no fígado. Quais são as diferenças nos mecanismos pelos quais a proliferação celular é induzida nessas doenças?

CAPÍTULO 19

Sexo e Genética

Células individuais se reproduzem pela duplicação de seu DNA e posterior divisão em duas novas células. Esse processo básico ocorre em todas as espécies existentes – seja nas células de organismos pluricelulares, seja em células de vida livre, como é o caso de bactérias e leveduras – e permite que cada célula passe sua informação genética para as gerações futuras.

No entanto, a reprodução de organismos pluricelulares – seja um peixe ou uma mosca, seja uma pessoa ou uma planta – é uma situação muito mais complicada. Organismos pluricelulares devem passar por ciclos de desenvolvimento elaborados, nos quais todas as células, tecidos e órgãos de um indivíduo devem ser gerados a partir de uma única célula inicial. Além disso, essa célula inicial não será uma célula qualquer, ela tem uma origem peculiar: na maioria das espécies animais e vegetais, ela é produzida a partir da fusão de duas células, derivadas de dois indivíduos distintos – a mãe e o pai. Como resultado dessa fusão – um evento central no processo da *reprodução sexuada* –, dois genomas se unirão para formar o genoma de um novo indivíduo. Os mecanismos que governam a herança genética em organismos que se reproduzem sexuadamente são, portanto, diferentes e mais complexos daqueles que operam em organismos que passam sua informação genética simplesmente via divisão celular.

Neste capítulo, analisaremos a biologia celular da reprodução sexuada. Iniciaremos discutindo por que os organismos se importam com o sexo e então descreveremos como eles o fazem. A geração de células especiais capazes de transferir a informação genética de cada parental envolve um processo especializado de divisão celular denominado meiose, e revisaremos os mecanismos desse processo. A seguir, discutiremos como Gregor Mendel – um monge austríaco preocupado com ervilhas – deduziu a base lógica desses mecanismos genéticos. Finalmente, descreveremos como os cientistas exploram a genética da reprodução sexuada para obter dicas a respeito da biologia humana, da origem dos seres humanos e para obter informações moleculares sobre doenças de seres humanos.

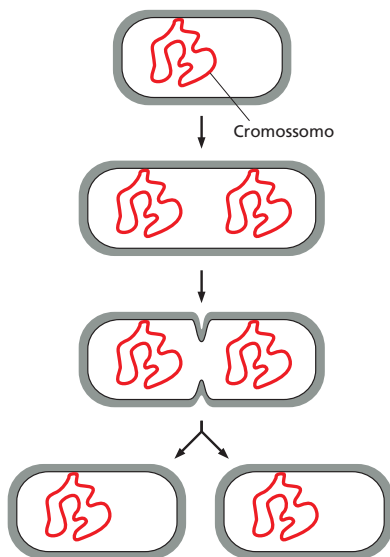



Figura 19-1 As bactérias se reproduzem pela simples divisão celular. A divisão de uma bactéria em duas células-filhas leva de 20 a 25 minutos sob condições ideais de crescimento.

OS BENEFÍCIOS DO SEXO

A maioria das criaturas que nos circundam se reproduzem sexuadamente. No entanto, diversos organismos, especialmente aqueles invisíveis a olho nu, podem reproduzir-se sem o uso do sexo. As bactérias e outros organismos unicelulares podem reproduzir-se pela simples divisão celular (Figura 19-1). Diversas plantas também se reproduzem assexuadamente, formando esporões multicelulares que mais tarde se separam de seu parental dando origem a plantas independentes. Mesmo no reino animal, existem espécies que podem reproduzir-se por brotamento (Figura 19-2), e alguns vermes podem separar-se em duas porções, cada uma das quais regenera a metade complementar. Além disso, as fêmeas de algumas espécies de insetos, lagartos e também aves podem produzir ovos que se desenvolvem *partenogeneticamente* – ou seja, sem a necessidade de machos, espermatozoides ou de fertilização – em proles adultas que então se reproduzem dessa mesma forma.

No entanto, se um dado sistema de **reprodução assexuada** é simples e direto, ele dá origem a uma prole geneticamente idêntica ao organismo parental. A **reprodução sexuada**, por outro lado, envolve a mistura do genoma de dois diferentes indivíduos para a produção de uma nova geração com indivíduos não somente distintos entre si, mas também distintos de ambos os parentais. Esse sistema de reprodução parece ser extremamente vantajoso, visto que a grande maioria das plantas e dos animais o adotou.

A reprodução sexuada envolve tanto células diploides quanto células haploides

Organismos que se reproduzem sexuadamente são em geral *diploides*: cada célula contém dois conjuntos de cromossomos – um conjunto de cromossomos *maternos* e um conjunto de cromossomos *paternos* –, um herdado de cada parental. Os dois parentais, como membros da mesma espécie, possuem conjuntos similares de cromossomos, exceto no que diz respeito aos **cromossomos sexuais** – cromossomos especializados presentes em alguns organismos e que distinguem os machos das fêmeas. Desse modo, cada célula diploide possui duas cópias de cada gene, com exceção dos genes que ocorrem nos cromossomos sexuais, os quais podem estar presentes em uma única cópia.

O que torna os indivíduos de uma mesma espécie diferentes uns dos outros é o fato de os genes apresentarem diferentes variantes, ou **alelos**. Para cada gene, geralmente vários alelos diferentes estão presentes no *pool* genético de uma espécie. Isso significa que as duas cópias de um determinado gene presentes em um dado indivíduo podem ser diferentes tanto uma da outra quanto das cópias que estão presentes em outros indivíduos. Graças à reprodução sexuada, cada novo indivíduo representa uma nova combinação de alelos.

Figura 19-2 Uma hidra se reproduz assexuadamente. Esse organismo pluricelular relativamente simples se reproduz por brotamentos (*setas*) que são geneticamente idênticos a seu parental. Por fim, os brotamentos se desconectam do organismo parental e vivem de forma independente. (Cortesia de Amata Hornbruch.)

Diferentemente das demais células de um organismo diploide, as células especializadas que desempenham a principal função na reprodução sexuada – as **células germinativas** ou **gametas** – são *haploides*, ou seja, elas contêm apenas um conjunto de cromossomos. Caracteristicamente, dois tipos de gametas são produzidos. Em animais, um gameta é grande e não apresenta locomoção própria, sendo denominado óvulo; o outro é pequeno e apresenta locomoção própria, sendo denominado espermatozoide (Figura 19-3). Essas células germinativas haploides são geradas quando uma célula diploide sofre meiose. Durante a meiose, os cromossomos dos pares cromossômicos são separados e reorganizados em novas combinações, formando conjuntos cromossômicos únicos. Os dois tipos de gametas haploides diferentes se fusionam para a formação de uma célula diploide (o ovo fertilizado, ou **zigoto**), o qual apresenta uma nova combinação de cromossomos (Figura 19-4). O zigoto assim produzido se desenvolve em um novo indivíduo, o qual apresenta um conjunto diploide de cromossomos que é distinto tanto de um quanto do outro parental.

No caso da maior parte dos animais pluricelulares, incluindo os vertebrados, praticamente todo o ciclo de vida ocorre sob a forma diploide. As células haploides nesses organismos possuem uma vida breve, não sofrem divisões e são altamen-

Figura 19-3 Apesar de sua imensa diferença em tamanho, os espermatozoides e os óvulos contribuem igualmente para as características genéticas do zigoto. Essa diferença em tamanho (o óvulo contém uma grande quantidade de citoplasma, ao passo que o espermatozoide é praticamente desprovido de citoplasma) é consistente com nosso conhecimento de que o citoplasma não é a base da herança. Se esse fosse o caso, a contribuição das fêmeas para as características da prole seria muito maior do que a contribuição dos machos. A figura ilustra uma microfotografia eletrônica de varredura de um óvulo com espermatozoides humanos aderidos à sua superfície. Apesar de diversos espermatozoides estarem ligados ao óvulo, apenas um irá fertilizá-lo. (Cortesia de David M. Phillips/Photo Researchers, Inc.)

te especializadas para a sua função de gametas; assim, elas devem ser geradas, quando necessário, a partir de células precursoras diploides existentes no orga-

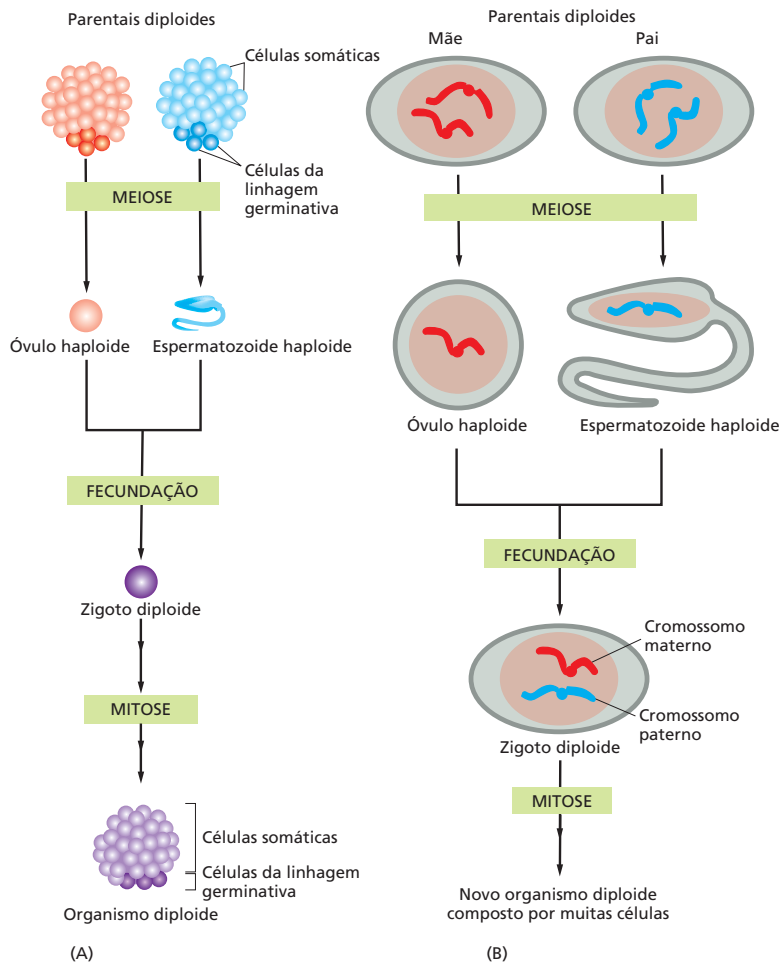
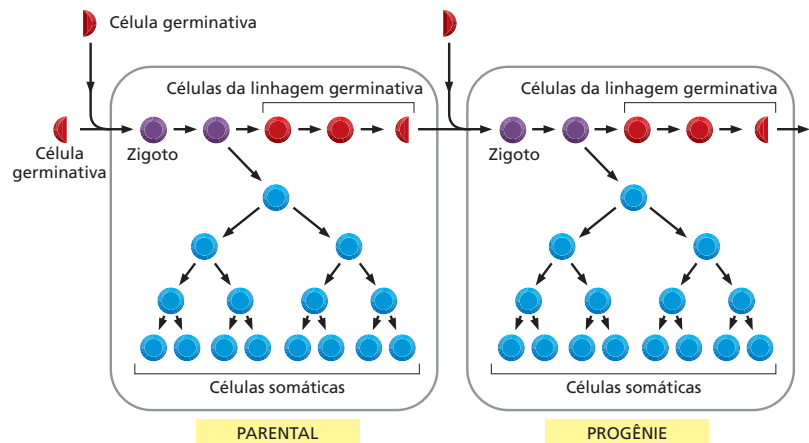



Figura 19-4 A reprodução sexuada envolve tanto células haploides quanto diploides. (A) Células de organismos eucarióticos superiores proliferam em fase diploide para a formação de um organismo pluricelular; gametas haploides – o óvulo e os espermatozoides – são formados por meiose. Esses gametas se unem na fecundação para gerar um zigoto diploide, o qual se desenvolverá em um organismo diploide que é geneticamente distinto de ambos os parentais. Em organismos pluricelulares, as células da linhagem germinativa (*coloração escura*) são as células precursoras que dão origem aos gametas; as células somáticas (*coloração clara*) são as demais células do organismo. (B) O mesmo processo está ilustrado com a representação dos cromossomos envolvidos. Para simplificar, apenas um cromossomo está ilustrado em cada gameta, e os espermatozoides foram bastante aumentados (ver Figura 19-3 para a comparação de tamanhos reais).

Figura 19-5 Células da linhagem germinativa e células somáticas desempenham tarefas fundamentalmente diferentes. Em organismos de reprodução sexuada, células da linhagem germinativa (*vermelhas*) são determinadas precocemente no desenvolvimento. Essas células propagam a informação genética para a próxima geração. Células somáticas (*azuis*), que formam o corpo do organismo e consequentemente são necessárias para a reprodução sexuada, não deixam progênie.

nismo. Essa linhagem celular precursora, dedicada à produção das células germinativas, é denominada **linhagem germinativa**. As **células somáticas**, as quais formam o restante do organismo, não estão envolvidas no processo de formação dos descendentes (Figura 19-5). De certa forma, as células somáticas existem apenas para auxiliar as células da linhagem germinativa a sobreviver e a propagar-se.

Assim, o ciclo de reprodução sexuada envolve uma alternância entre células haploides, cada uma carregando um conjunto de cromossomos, e gerações de células diploides, cada uma carregando dois conjuntos de cromossomos. A mistura entre os genomas, que caracteriza a reprodução sexuada é obtida por meio da fusão de duas células haploides que formarão uma célula diploide. Dessa forma, pelos ciclos de diploidia, meiose, haploidia e fusão celular, antigas combinações de genes deixam de existir e novas combinações são criadas.

A reprodução sexuada confere vantagem competitiva aos organismos

As novas combinações de alelos produzidas em cada ciclo de reprodução sexuada são geradas por processos aleatórios, e elas podem tanto representar uma alteração para melhor quanto para pior. Por que, então, a capacidade de testar novas combinações genéticas confere aos indivíduos que se reproduzem sexuadamente uma vantagem competitiva em relação aos indivíduos que se reproduzem por meio de processos assexuados? Essa questão continua a intrigar os pesquisadores de genética de populações; no entanto, uma das vantagens aparentes é que a reorganização dos genes pela reprodução sexuada pode auxiliar uma espécie a sobreviver em um ambiente cuja variabilidade não é previsível. Se dois parentais produzem uma grande prole contendo uma ampla gama de diferentes combinações gênicas, a probabilidade de que pelo menos um indivíduo da prole apresente uma combinação de características necessárias para a sua sobrevivência é aumentada. Isso pode explicar por que mesmo organismos unicelulares, como as leveduras, eventualmente aplicam uma forma simples de reprodução sexuada. Caracteristicamente, as leveduras se utilizam desse comportamento como alternativa da divisão celular comum quando existe certa pressão e risco de restrição de nutrientes. As leveduras com um defeito genético que as impedem de se reproduzir sexuadamente apresentam uma capacidade reduzida para evoluir e adaptar-se quando são colocadas sob condições de estresse.

A reprodução sexuada pode também ser vantajosa em virtude de uma outra razão. Em qualquer população, novas mutações ocorrem continuamente, dando origem a novos alelos, e muitas dessas novas mutações podem ser deletérias. A reprodução sexuada pode acelerar a eliminação desses alelos deletérios e auxiliar processos que impeçam que eles se acumulem na população. Por meio do acasalamento apenas com machos mais bem adaptados, as fêmeas selecionam as boas combinações de alelos e fazem com que as combinações ruins sejam perdidas e desapareçam dessa população de forma mais eficiente do que se observaria por

meio de outros sistemas. De acordo com essa hipótese, a qual é sustentada por alguns cálculos cuidadosos de custo-benefício, a reprodução sexuada é favorecida, pois os machos podem atuar como aparelhos de filtragem: os machos que obtêm sucesso no acasalamento permitem que os melhores – e apenas os melhores – conjuntos de genes sejam passados para a próxima geração, ao passo que os machos que não conseguem se acasalar atuam como uma "lata de lixo" genética – uma forma de descartar da população os conjuntos de genes não adequados. Naturalmente, a evolução já sofreu muitas reviravoltas desde o surgimento da reprodução sexuada, e, especialmente em organismos sociais, é necessário salientar que os machos algumas vezes apresentam outras utilidades.

Quaisquer que sejam as vantagens, a reprodução sexuada foi nitidamente favorecida na evolução. Na seção seguinte, discutiremos suas características principais, com especial atenção à meiose, o processo por meio do qual as células sexuais são formadas.

MEIOSE E FERTILIZAÇÃO

A compreensão atual do ciclo de eventos fundamental envolvido na reprodução sexuada cresceu a partir de descobertas relatadas em 1888, quando Theodor Boveri observou que ovos fertilizados de um parasita continham quatro cromossomos, ao passo que os gametas desse mesmo parasita (espermatozoides e óvulos) continham apenas dois. Essa observação revelou que os gametas são **haploides** – eles contêm um único conjunto de cromossomos. Todas as outras células do organismo, incluindo-se as células que dão origem aos gametas, são **diploides** – elas contêm dois conjuntos de cromossomos, um de origem materna e um de origem paterna. Assim, os espermatozoides e os óvulos devem ser formados por meio de um tipo especial de divisão celular durante a qual o número de cromossomos é reduzido exatamente à metade. O termo **meiose** foi cunhado para descrever essa forma de divisão celular; esse nome tem origem em uma palavra grega que significa "diminuição" ou "redução".

A partir dos experimentos de Boveri com parasitas e outros organismos, tornou-se evidente que o comportamento dos cromossomos, que nessa época eram considerados como simples corpos microscópicos corados com função desconhecida, apresentava paralelos com o padrão de herança, onde cada um dos dois parentais contribui equitativamente para a determinação das características de sua progênie, apesar da enorme diferença de tamanho existente entre óvulos e espermatozoides (ver Figura 19-3). Essa foi a observação-chave que levou à compreensão de que os cromossomos continham o material hereditário. O estudo da reprodução sexuada e da meiose, portanto, tem um papel fundamental na história da biologia celular.

Nesta seção, descreveremos a biologia celular envolvida nesses processos a partir de um ponto de vista moderno, focando especialmente na elaborada dança dos cromossomos que ocorre quando a célula realiza a meiose. Iniciaremos nosso estudo com uma revisão geral sobre como a meiose distribui os cromossomos para os gametas. A seguir, observaremos mais detalhadamente como ocorre a recombinação entre um par de cromossomos e como eles são segregados durante o processo, redistribuindo, dessa forma, os genes de origem materna e paterna em novas combinações. Também discutiremos o que acontece quando a meiose segue um caminho errado. Finalmente, consideraremos de forma breve o processo de fertilização, no qual os gametas se unem para a formação de um novo e geneticamente distinto indivíduo.

As células germinativas haploides são produzidas a partir de células diploides pela meiose

Quando as células diploides se dividem pelo sistema comum de mitose, elas inicialmente duplicam seus dois conjuntos de cromossomos de forma exata, o que permite que dois conjuntos cromossômicos idênticos – correspondentes ao conjunto de origem materna completo mais o conjunto de origem paterna completo – sejam

transmitidos para cada célula-filha (conforme discussão do Capítulo 18). A meiose é diferente, pois um único conjunto de cromossomos – que é composto por parte do conjunto cromossômico de origem materna e parte do conjunto cromossômico de origem materna – é direcionado para cada gameta, a partir de uma célula diploide inicial. Além disso, por mais estranho que possa parecer, pois a consequência final é uma redução no número de cromossomos, a meiose começa por um ciclo de replicação de DNA, que duplica todos os cromossomos. A redução no número de cromossomos ocorre porque esse único ciclo de replicação é seguido de duas divisões celulares sucessivas. Poderíamos imaginar que a meiose teria condições de ocorrer por meio de uma única alteração no processo de divisão celular mitótico normal, em que a replicação do DNA (na fase S) fosse eliminada. Em princípio, um único ciclo de divisão celular produziria diretamente duas células haploides. No entanto, por razões que ainda desconhecemos, esse não foi o caminho escolhido.

A meiose em diversas espécies é um processo relativamente demorado a ser executado, com uma duração muito maior do que qualquer mitose: a meiose em machos humanos, por exemplo, necessita de 24 dias, e em fêmeas humanas, pode levar décadas para ser completada. A meiose tem início em células diploides especializadas da linhagem germinativa, presentes nos ovários ou nos testículos. Cada uma dessas células contém duas cópias de cada cromossomo, uma herdada do organismo paterno (o *homólogo paterno*) e a outra de origem materna (o *homólogo materno*). Na primeira etapa da meiose, os cromossomos dessa célula diploide são replicados: como ocorre em qualquer célula que se prepara para uma divisão, esses cromossomos duplicados permanecem unidos ao cromossomo original, como gêmeos siameses. A próxima fase do processo é característica da meiose. Cada cromossomo paterno duplicado localiza e forma um par com seu homólogo materno duplicado. Esse pareamento especializado garante que os homólogos irão segregar de forma adequada ao longo das divisões celulares subsequentes, de tal forma que os gametas resultantes receberão um conjunto haploide completo de cromossomos.

Duas divisões celulares sucessivas, denominadas divisão meiótica I e divisão meiótica II, separam os cromossomos, direcionando um conjunto para cada uma das quatro células haploides produzidas. Visto que o direcionamento dos homólogos para cada célula ocorre de modo aleatório, os cromossomos maternos e paternos originais são reorganizados em diferentes combinações nos gametas que serão finalmente formados a partir dessas células haploides. Durante a fertilização, dois gametas serão unidos, dando origem a um zigoto diploide geneticamente distinto de qualquer um dos parentais (ver Figura 19-4B). A seguir, o zigoto se desenvolverá em um organismo pluricelular por meio de ciclos repetidos de multiplicação e divisão celular seguidos de diferenciação e especialização celular.

Dessa forma, a meiose produz quatro células geneticamente distintas que contêm a metade do número original de cromossomos presentes na célula parental. Em contraste, a mitose produz duas células-filhas geneticamente idênticas. A seguir, discutiremos com mais detalhes os eventos moleculares que ocorrem durante o ciclo meiótico, começando com o pareamento dos cromossomos maternos e paternos – um processo essencial para essa forma especializada de divisão celular.

A meiose envolve um processo especial de pareamento cromossômico

Conforme salientado, antes que a célula sofra divisão – seja por meiose, seja por mitose –, ela duplicará todos os seus cromossomos. As cópias gêmeas de cada cromossomo completamente duplicado, denominadas **cromátides-irmãs**, permanecerão, de início, fortemente unidas entre si. No entanto, o modo pelo qual esses cromossomos replicados serão manipulados difere entre a meiose e a mitose. Na mitose, como vimos no Capítulo 18, os cromossomos replicados se alinham de forma aleatória sobre a placa metafásica; conforme a mitose avança, as duas cromátides-irmãs anteriormente unidas são separadas originando cromossomos individuais, e as duas células-filhas produzidas por citocinese herdam uma cópia de cada cromossomo paterno e uma cópia de cada cromossomo materno. Assim, ambos os conjuntos de informação genética são transmitidos

Figura 19-6 Durante a meiose, os cromossomos homólogos formam pares antes de se alinharem no fuso. Na mitose (A), os cromossomos maternos (M) e paternos (P) se alinham independentemente na placa metafásica; cada um desses cromossomos consiste em um par de cromátides-irmãs que, a seguir, será separado. Em contraste, na divisão I da meiose (B), os cromossomos homólogos maternos e paternos formam pares antes de se alinharem na placa metafásica; na primeira divisão meiótica, cada célula-filha recebe, aleatoriamente, ou o homólogo materno ou o homólogo paterno. Tanto na mitose quanto na meiose, os cromossomos foram duplicados antes de se alinharem. O fuso está ilustrado em *verde*.

inalterados para cada uma das células-filhas, as quais são, por consequência, diploides e geneticamente idênticas.

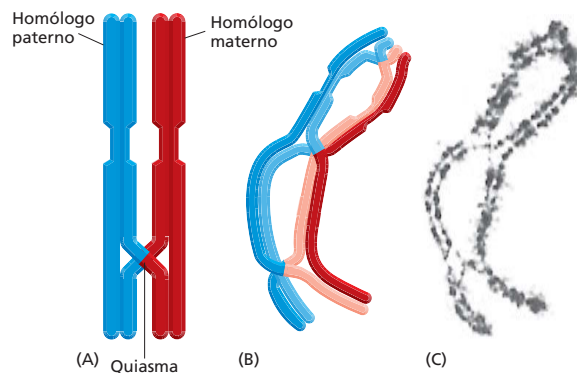
Os eventos que ocorrem durante a primeira divisão meiótica se assemelham à sequência de estágios que a célula atravessa durante a mitose: na prófase, os cromossomos duplicados são condensados; na metáfase, esses se alinham no centro do fuso meiótico, e, na anáfase, eles segregam em direção aos polos. Para uma revisão a respeito desses estágios, ver Painel 18-1 (p. 626-627). A necessidade de dividir o número de cromossomos pela metade durante a meiose, no entanto, acrescenta uma nova demanda para a maquinaria de divisão celular e se constitui na primeira grande diferença entre meiose e mitose. Na divisão I da meiose, os cromossomos homólogos paternos e maternos replicados (incluindo os dois cromossomos sexuais replicados) formam pares, unindo-se longitudinalmente uns aos outros antes de se alinharem sobre o fuso (Figura 19-6). Esse pareamento físico dos dois cromossomos equivalentes – denominados **cromossomos homólogos** ou **homólogos** – é essencial, pois permite que os cromossomos de origem paterna e materna segreguem em diferentes células-filhas nessa primeira divisão. A alocação dos homólogos materno e paterno referentes a cada cromossomo, nas células-filhas, ocorre de forma aleatória. Dessa forma, os cromossomos paternos e maternos originais – com seus diferentes conjuntos de alelos – serão embaralhados e reorganizados em novas combinações em cada célula-filha dessa primeira divisão meiótica.

O mecanismo por meio do qual os homólogos (e os dois cromossomos sexuais) reconhecem seu par é uma questão ainda não completamente desvendada. Em diversos organismos, a associação inicial – o processo de **pareamento** – parece ser mediada por uma interação entre sequências de DNA complementares maternas e paternas existentes em diversas regiões que se encontram amplamente dispersas ao longo dos cromossomos. A estrutura formada quando os cromossomos duplicados estão pareados recebe o nome de **bivalente** e contém quatro cromátides (Figura 19-7). O bivalente se forma e se mantém durante o longo período da prófase meiótica, um estágio que pode persistir pelo período de vários anos em alguns organismos.

Figura 19-7 Cromossomos duplicados se alinham durante a meiose para a formação de um bivalente. Essa estrutura, que contém quatro cromátides-irmãs, é formada durante a prófase meiótica.

Pode ocorrer recombinação entre os cromossomos maternos e os paternos

A descrição da divisão meiótica I que fizemos até o momento foi extremamente simplificada, pois não mencionamos uma característica essencial do processo. Em quase todos os organismos que se reproduzem sexuadamente, o pareamento entre os cromossomos de origem paterna e materna é acompanhado pela **recombinação**, um processo em que há troca de DNA entre duas sequências nucleotídicas idênticas

Figura 19-8 Eventos de recombinação criam quiasmas entre cromátides não irmãs no bivalente. (A) Neste conjunto de homólogos pareados, um único evento de recombinação ocorreu durante a prófase, criando um único quiasma. (B) Um pouco mais tarde na meiose, os homólogos materno e paterno começarão sua separação, permanecendo unidos apenas nas regiões onde houve recombinação. (C) Uma fotografia de um bivalente de gafanhoto, nesse estágio, com três quiasmas. (C, cortesia de Bernard John.)

ou bastante similares (ver Figura 6-31). Em uma célula diploide da linhagem germinativa, a recombinação ocorre durante a longa prófase da primeira divisão meiótica. Essa recombinação resulta tipicamente em uma troca física de segmentos homólogos entre os cromossomos materno e paterno em um evento também conhecido como **recombinação**, ou, em inglês, ***crossing-over*** (ver Figura 6-30).

A recombinação meiótica é um processo complexo catalisado por uma maquinaria proteica intrincada e é dependente da formação de um *complexo sinaptonêmico*. Conforme os homólogos duplicados se aproximam para o pareamento, esse elaborado complexo os mantém conectados e alinhados, de forma que possa facilmente ocorrer a recombinação genética entre cromátides não irmãs. Essa estrutura também atua no espaçamento dos eventos de *crossing-over* que ocorrem sobre cada cromossomo.

Cada uma das duas cromátides de um cromossomo duplicado pode recombinar com uma das duas cromátides do outro cromossomo, no bivalente. Ao término da prófase, o complexo sinaptonêmico terá se dissociado, permitindo que os homólogos estejam separado ao longo de praticamente toda sua a extensão. No entanto, cada par de homólogos duplicados se mantém unido por meio de pelo menos um **quiasma** – a conexão que corresponde a um evento de recombinação entre duas cromátides não irmãs (**Figura 19-8**). (Essa estrutura tem o nome derivado da letra grega χ, cuja aparência lembra uma cruz.) Diversos bivalentes contêm mais de um quiasma, indicando que múltiplas recombinações podem ocorrer entre cromossomos homólogos (ver Figura 19-8B e C e **Figura 19-9**). Em média, entre dois e três eventos de recombinação ocorrem entre cada par de cromossomos humanos durante a meiose I.

Figura 19-9 Múltiplos *crossing-overs* podem acontecer entre cromossomos homólogos. Uma microfotografia óptica ilustra os cromossomos espalhados de um oócito humano (precursor do óvulo) no estágio onde as quatro cromátides – maternas e paternas – ainda se encontram fortemente associadas: cada longa fita única (corada em *vermelho*) corresponde a um bivalente que contém quatro dupla-hélices. Regiões de recombinação estão marcadas pela presença de uma proteína (corada em *verde*) que é um componente essencial para a maquinaria de recombinação. (De C. Tease *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 70:1469-1479, 2002. Com permissão de Elsevier.)

A recombinação durante a meiose é a principal fonte de diversidade genética em espécies que se reproduzem sexuadamente. Por meio de uma redistribuição dos constituintes genéticos de cada um dos cromossomos nos gametas, a recombinação auxilia a produzir indivíduos com novas combinações de genes. A recombinação não apenas dá origem a novas combinações de genes de origem paterna e materna em cada um dos cromossomos, mas também desempenha um outro papel importante na meiose. Como esse processo mantém os cromossomos homólogos unidos durante a prófase I, a recombinação garante que os homólogos paternos e maternos irão segregar corretamente, um em relação ao outro, na primeira divisão meiótica, como será discutido a seguir.

O pareamento de cromossomos e a recombinação asseguram a adequada segregação dos homólogos

Na maioria dos organismos, a recombinação durante a meiose é necessária para a correta segregação dos dois homólogos duplicados para os dois núcleos-filhos distintos. Os quiasmas criados pelos eventos de recombinação desempenham um papel essencial nesse processo, mantendo os cromossomos homólogos, paterno e materno, unidos até sua separação, mediada pelo fuso, na anáfase I. Antes da anáfase I, os dois polos do fuso puxam os homólogos duplicados em sentidos opostos, e o quiasma apresenta resistência a essa pressão (**Figura 19-10A**). Assim, o quiasma ajuda a posicionar e estabilizar os bivalentes sobre a placa

Figura 19-10 Os quiasmas asseguram a segregação adequada dos cromossomos na meiose. (A) Na metáfase I, os quiasmas criados pela recombinação mantêm os homólogos materno e paterno unidos. Nessa etapa, proteínas coesinas (não ilustradas) mantêm as cromátides-irmãs grudadas ao longo de toda sua extensão. Os cinetocoros das cromátides-irmãs atuam como uma unidade única, e microtúbulos que se associam a eles apontam para uma única direção. (B) Na anáfase I, as coesinas que mantêm unidos os braços das cromátides-irmãs são degradadas; as cromátides-irmãs ainda são mantidas em união pelas coesinas no centrômero. Esse arranjo permite que as cromátides-irmãs permaneçam unidas quando os homólogos recentemente recombinados se separam e são puxados para os polos opostos do fuso. Em contraste, na anáfase da mitose, braços e centrômeros sofrem separação no mesmo momento.

metafásica. Além dos quiasmas, que mantêm os homólogos materno e paterno duplicados unidos, proteínas coesinas mantêm os braços das cromátides-irmãs fortemente conectados entre si, ao longo de seu comprimento (ver Figuras 19-8 e 18-15). As cromátides-irmãs são desgrudadas quando as coesinas presentes nos braços cromossômicos são degradadas no início da anáfase I, permitindo que os homólogos recentemente recombinados sejam separados (Figura 19-10B).

A segunda divisão meiótica produz células-filhas haploides

A primeira divisão da meiose não origina células com um conteúdo haploide de DNA. Para que esse objetivo seja alcançado, cada célula deverá atravessar um segundo ciclo de divisão, a meiose II, a qual ocorrerá sem que exista uma nova duplicação de DNA e sem que ocorra um período significativo de interfase. Um fuso se forma, os cromossomos se alinham sobre o centro desse fuso, e as cromátides-irmãs são separadas para a formação de células-filhas com um conteúdo haploide de DNA. Na divisão II da meiose, os cinetocoros de cada par de cromátides-irmãs estão ligados a microtúbulos do cinetocoro, os quais estão direcionados para sentidos opostos, como ocorre em uma divisão mitótica comum. Essa configuração permite que cromátides individuais sejam arrastadas para diferentes células-filhas na anáfase II (**Figura 19-11**). Quando as coesinas específicas de meiose, que mantêm as cromátides-irmãs unidas pelo centrômero, são degradadas repentinamente, as cromátides se separam.

Em resumo, a meiose consiste em um único ciclo de duplicação de DNA seguido por dois ciclos de divisão celular, de tal forma que quatro células haploides

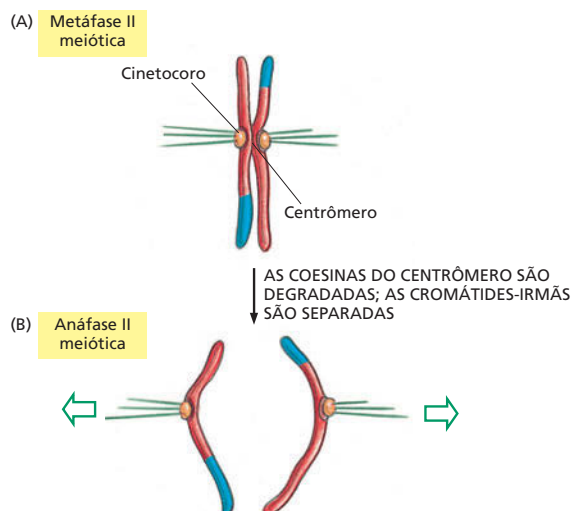



Figura 19-11 Na meiose II, assim como na mitose, os cinetocoros de cada cromátide-irmã atuam independentemente, permitindo que as duas cromátides-irmãs sejam atraídas para polos opostos. (A) Na metáfase II, os cinetocoros das cromátides-irmãs apontam em direções opostas. (B) As coesinas que mantêm as cromátides-irmãs unidas pelo centrômero são degradadas, permitindo que os microtúbulos do cinetocoro puxem as cromátides individualmente para polos opostos.

distintas são produzidas a partir de cada célula diploide que entra nesse processo (**Animação 19.1**). Em contraste, um ciclo tradicional de mitose tem início com uma célula diploide e produz duas células diploides idênticas. Os dois processos são comparados na **Figura 19-12**.

As células haploides contêm informação genética reorganizada

Gêmeos monozigóticos, que se desenvolveram a partir de um único zigoto, são geneticamente idênticos; exceto nesse caso, nenhum outro par de irmãos será

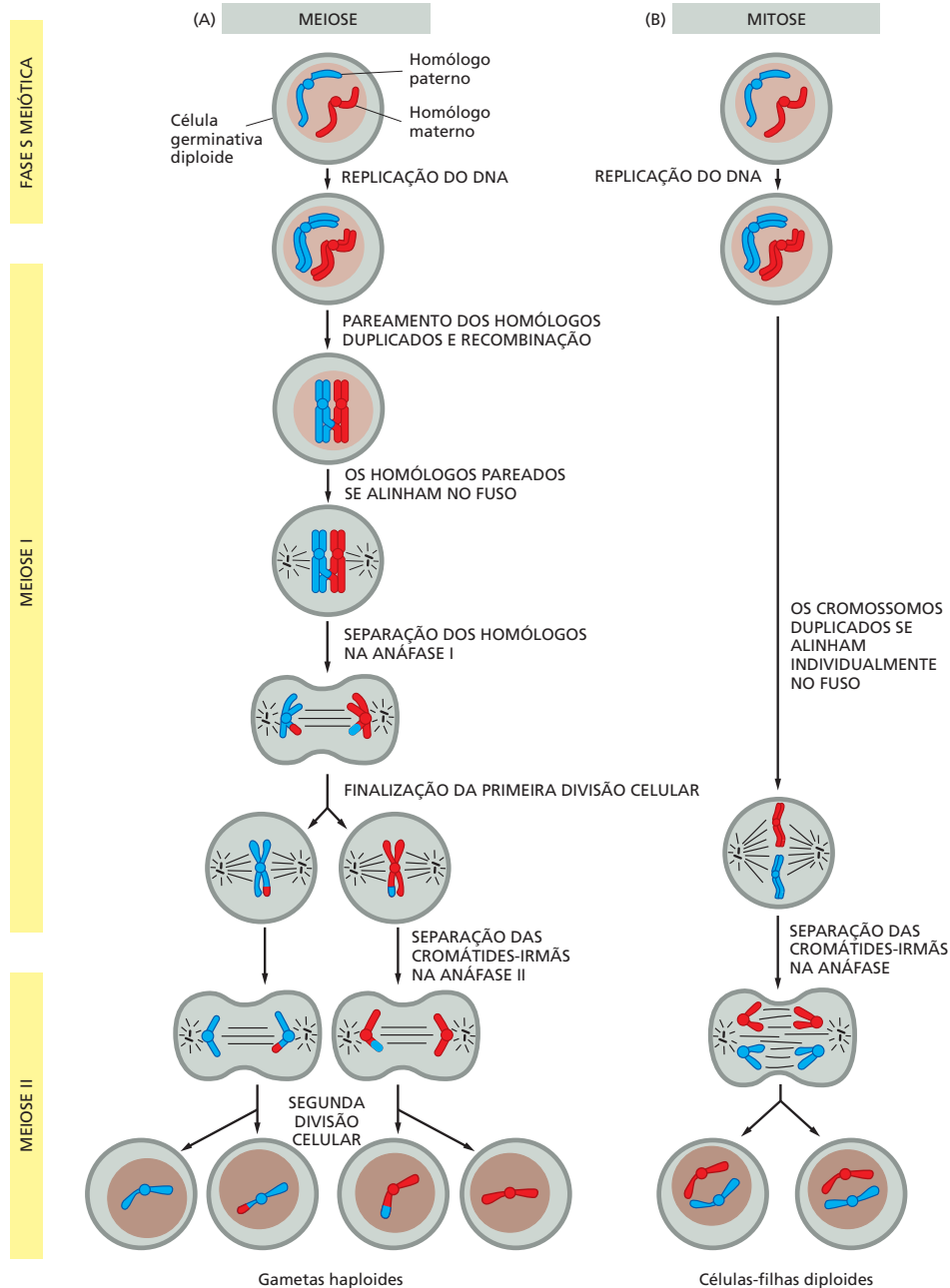



Figura 19-12 A meiose gera quatro células haploides diferentes, ao passo que a mitose produz duas células diploides idênticas. Como na Figura 19-4B, apenas um par de cromossomos homólogos está ilustrado. Na meiose, duas divisões celulares são necessárias após a duplicação do DNA, para que ocorra a produção de gametas haploides. Cada célula diploide que entra em meiose produz quatro células haploides, ao passo que cada célula diploide que se divide por mitose produz duas células diploides. Enquanto a mitose e a meiose II geralmente ocorrem em um período de horas, a meiose I pode levar dias, meses ou mesmo anos em virtude do grande período de tempo despendido em prófase.

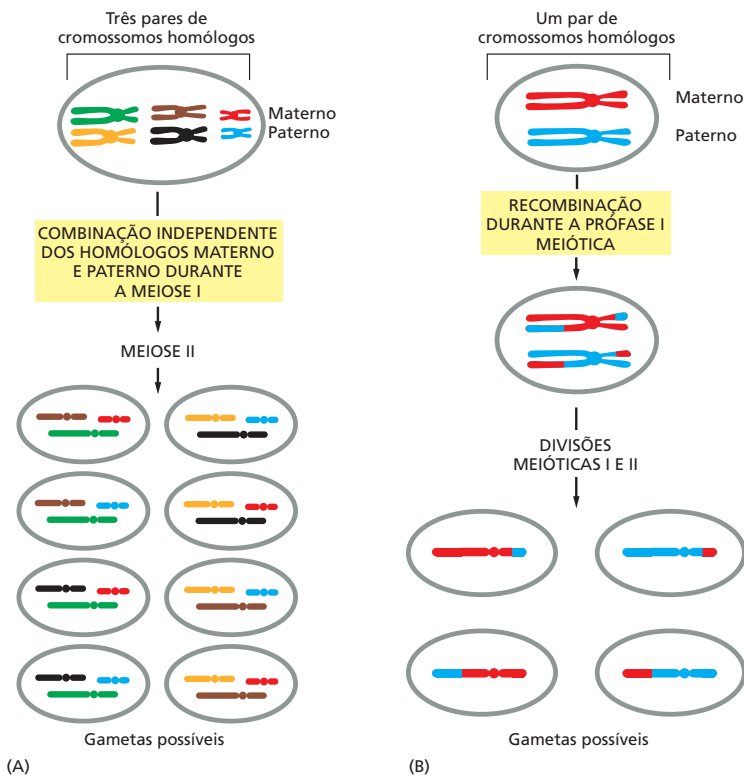



Figura 19-13 Dois tipos de rearranjos geram novas combinações cromossômicas durante a meiose. (A) A combinação independente de cromossomos homólogos maternos e paternos durante a meiose produz 2^n diferentes gametas haploides em um organismo que possui n cromossomos. No exemplo, $n = 3$, e existem 2^3, ou 8, diferentes gametas possíveis. Para simplificar, não foi ilustrada recombinação nesse esquema. (B) A recombinação durante a prófase I meiótica promove a troca de segmentos de cromossomos homólogos e consequentemente reorganiza os genes de cromossomos específicos. Para simplificar, apenas um par de cromossomos homólogos foi ilustrado. Tanto a combinação independente quanto a recombinação ocorrem a cada meiose.

geneticamente idêntico. Essa afirmação é verdadeira, pois mesmo antes da fecundação, a meiose já produziu dois tipos de reorganização genética aleatórias.

Inicialmente, como vimos, os cromossomos maternos e paternos são embaralhados e distribuídos entre os gametas durante a meiose. Apesar de os cromossomos serem cuidadosamente distribuídos de forma que cada gameta receberá uma única cópia de cada cromossomo, a escolha entre as duas cópias é aleatória. Assim, cada gameta contém alguns cromossomos de origem paterna e alguns de origem materna (Figura 19-13A). Esse tipo de redistribuição é totalmente direcionado pelo posicionamento de cada bivalente quando de seu alinhamento no fuso, durante a metáfase I. A captura do homólogo paterno ou materno pelo fuso que se origina a partir de um polo ou de outro depende da direção para a qual o bivalente está voltado quando os microtúbulos se conectam a seus cinetocoros (ver Figura 19-10). Visto que a orientação de cada bivalente no momento de sua captura é completamente aleatória, a distribuição de cromossomos de origem paterna e materna também o será.

Graças a só esse tipo de distribuição, cada indivíduo pode potencialmente produzir 2^n gametas geneticamente diferentes, onde n corresponde ao número haploide de cromossomos. Cada ser humano, por exemplo, pode teoricamente produzir $2^{23} = 8{,}4 \times 10^6$ diferentes gametas simplesmente a partir da redistribuição aleatória dos homólogos paternos e maternos que ocorre na meiose. O número real de diferentes gametas que cada pessoa pode produzir, no entanto, é muito maior do que 2^{23}. Isso ocorre porque a recombinação durante a meiose fornece uma segunda fonte de reorganização genética aleatória. Como mencionado, entre dois e três *crossing-over* ocorrem, em média, em cada par de cromossomos humanos, a cada meiose. Esse processo permite que genes de origem paterna e materna, que anteriormente se encontravam em cromossomos separados, sejam posicionados sobre o mesmo cromossomo, como ilustrado na Figura 19-13B. Visto que a recombinação ocorre em regiões mais ou menos aleatórias sobre o cromossomo, cada meiose produzirá quatro conjuntos inteiramente novos de cromossomos.

O rearranjo de cromossomos na meiose, junto à recombinação de genes que ocorre por meio do *crossing-over*, fornece uma fonte praticamente ilimitada

QUESTÃO 19-1

Por que não seria desejável para um organismo usar as primeiras etapas da meiose (incluindo-se as etapas até a divisão I da célula meiótica) não apenas para a meiose, mas também para a divisão mitótica normal de células somáticas?

de variabilidade genética para os gametas produzidos por um único indivíduo. Considerando que cada ser humano é formado pela fusão de dois desses gametas, um proveniente do pai e outro proveniente da mãe, não é de se estranhar a riqueza da diversidade humana que podemos observar em nosso redor, mesmo se considerarmos uma família específica.

QUESTÃO 19-2

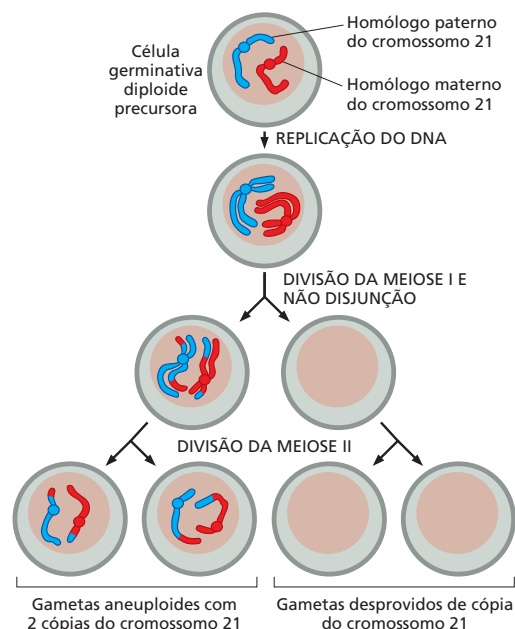
Desconsiderando-se os efeitos do *crossing-over* sobre os cromossomos, um indivíduo humano pode, potencialmente, produzir $2^{23} = 8,4 \times 10^6$ gametas geneticamente diferentes. Quantas dessas possibilidades são efetivamente utilizadas, em média, durante a vida de (A) um indivíduo do sexo feminino? (B) um indivíduo do sexo masculino?

A meiose não é à prova de erros

A distribuição de cromossomos que ocorre durante a meiose é um feito admirável do controle celular: em humanos, cada meiose necessita que a célula inicial mantenha absoluto controle de 92 cromossomos (23 pares, cada um dos quais previamente duplicados) e que ocorra a distribuição de um conjunto completo para cada gameta. Assim, não é de se admirar que ocorram erros na distribuição dos cromossomos durante esse complexo processo.

Às vezes, os homólogos não conseguem separar-se adequadamente – um fenômeno conhecido como *não disjunção*. Como resultado, algumas das células haploides produzidas não possuem um determinado cromossomo, ao passo que outras apresentam mais do que uma cópia desse mesmo cromossomo. Se utilizados para a fecundação, tais gametas darão origem a embriões anormais, a maioria dos quais não se desenvolverá. Alguns, no entanto, sobreviverão. A *síndrome de Down*, por exemplo, uma doença humana caracterizada por retardo mental severo e anomalias físicas específicas, é causada por uma cópia extra do Cromossomo 21. Essa falha resulta da não disjunção de um par do Cromossomo 21 durante a meiose, o que leva à formação de um gameta que contém duas cópias do Cromossomo 21, em vez de uma (**Figura 19-14**). Quando esse gameta anormal se fusiona com um gameta normal durante a fertilização, o embrião gerado conterá três cópias do Cromossomo 21, em vez de duas. Esse desequilíbrio cromossômico gera uma dose extra das proteínas codificadas no Cromossomo 21, e, dessa forma, interfere no desenvolvimento adequado do embrião.

A frequência de erros de segregação nos gametas humanos é muito alta, principalmente em mulheres: a não disjunção ocorre em aproximadamente 10% das meioses de oócitos humanos, dando origem a óvulos que contêm um número errado de cromossomos (uma condição denominada como *aneuploidia*). A aneuploidia ocorre menos frequentemente em espermatozoides, talvez em virtude da ocorrência de um controle de qualidade mais estringente durante o seu desenvolvimento em comparação ao que ocorre durante o desenvolvimento dos óvulos. Acredita-se que, se há uma falha durante a meiose em células masculi-

Figura 19-14 Erros na segregação cromossômica durante a meiose podem resultar em gametas com número incorreto de cromossomos. Neste exemplo, as cópias materna e paterna duplicadas do cromossomo 21 não segregaram adequadamente durante a primeira divisão meiótica. Como resultado, dois dos gametas não receberam qualquer cópia do cromossomo, e os outros dois gametas receberam duas, em vez de uma única cópia. Os gametas que receberam um número incorreto de cromossomos são chamados de gametas *aneuploides*. Se um deles participar do processo de fecundação, o zigoto resultante também apresentará um número anormal de cromossomos. Se o gameta possuindo duas cópias do cromossomo 21 se fusionar a um gameta normal, a criança derivada desse zigoto apresentará síndrome de Down.

nas, mecanismos de ponto de verificação do ciclo celular são ativados, bloqueando a meiose e direcionando a morte celular via apoptose. Independentemente de o erro de segregação ocorrer nos espermatozoides ou nos óvulos, acredita-se que a não disjunção seja uma das razões da alta taxa de insucesso gestacional (abortos espontâneos) no início da gravidez em humanos.

A fertilização reconstitui um genoma diploide completo

Tendo visto como os cromossomos são distribuídos durante a meiose, discutiremos brevemente como eles se reencontram no processo de **fertilização**, quando um novo zigoto, contendo um conjunto completo de cromossomos, é formado.

Dos 300 milhões de espermatozoides ejaculados durante um ato sexual, apenas aproximadamente 200 alcançam a região de fertilização no oviduto. Existem evidências de que sinais químicos liberados pelas células que estão em torno do óvulo liberado atraem os espermatozoides para esse óvulo; no entanto, a exata natureza dessas moléculas quimioatratoras é desconhecida. Quando encontra um óvulo, o espermatozoide deve migrar através de uma camada de células protetoras e então ligar-se a uma capa do óvulo, denominada *zona pelúcida*, e penetrar através dessa. Finalmente, o espermatozoide deve ligar-se à membrana plasmática que delimita o óvulo e fusionar-se a ela (**Figura 19-15**). Apesar de a fertilização normalmente ocorrer por meio desse processo de fusão entre espermatozoide e óvulo, ela também pode ser alcançada artificialmente pela injeção de um espermatozoide direto no citoplasma de um óvulo; esse processo é algumas vezes utilizado em clínicas de fertilização assistida quando existe algum problema que impede a fusão natural do espermatozoide com o óvulo.

Apesar de diversos espermatozoides poderem ligar-se a um mesmo óvulo, normalmente apenas um se fusionará à membrana citoplasmática e introduzirá seu DNA no citoplasma do óvulo. Essa etapa de controle é especialmente importante, pois garante que um óvulo fertilizado contenha dois – e apenas dois – conjuntos de cromossomos. Existem diversos mecanismos que evitam que mais de um espermatozoide fertilize um único óvulo. Em um desses mecanismos, o primeiro espermatozoide a penetrar induz a liberação de uma onda de íons Ca^{2+} no citoplasma do óvulo. O Ca^{2+} leva à secreção de enzimas que provocam um "enrijecimento" da zona pelúcida. Isso evita que outros espermatozoides que alcancem o óvulo penetrem em sua zona pelúcida e assegura que na corrida para a fertilização do óvulo exista um único campeão. Para assistir a uma onda de cálcio induzido pela fertilização, ver **Animações 16.4** e **19.2**.

Uma vez fertilizado, o óvulo é denominado **zigoto**. O processo só estará completo, no entanto, quando os dois núcleos haploides (denominados *pró-núcleos*) estiverem unidos e combinarem seus cromossomos formando um único núcleo diploide. A fertilização marca o início de um dos mais surpreendentes fenômenos de toda a biologia – o processo de embriogênese, no qual o zigoto se divide para a produção de um grande número de células diploides que se desenvolverão dando origem a um novo indivíduo.

Figura 19-15 **Um espermatozoide se liga à membrana plasmática de um óvulo.** Pode-se ver uma micrografia eletrônica de varredura de um espermatozoide humano em contato com um óvulo de hamster. O óvulo teve sua zona pelúcida retirada, expondo sua membrana plasmática, a qual é revestida por microvilosidades. Tais preparações de óvulos de hamster são algumas vezes utilizadas em clínicas de infertilidade para determinar se os espermatozoides de um indivíduo são capazes de penetrar em um óvulo. Os zigotos resultantes desse teste não são viáveis. (Cortesia de David M. Phillips.)

MENDEL E AS LEIS DA HERANÇA

Em organismos que se reproduzem assexuadamente, o material genético do parental é transmitido de forma exata para sua progênie. Assim, a prole é geneticamente idêntica ao parental único. Antes do advento de Mendel e de seus trabalhos com ervilhas, alguns biólogos acreditavam que a herança na espécie humana apresentava esse mesmo padrão (**Figura 19-16**).

No entanto, mesmo que se diga que as crianças são semelhantes a seus pais, elas não são "cópias em papel carbono" da mamãe ou do papai. Em organismos que se reproduzem sexuadamente, a prole tende a apresentar uma mistura de características derivadas de ambos os parentais. Esse fato foi essencial para os primeiros geneticistas (os cientistas que estudam os processos da hereditariedade) em seus esforços visando à revelação das leis da herança genética. Para a compreensão dos princípios que determinam a hereditariedade, é necessário acompa-

Figura 19-16 **Uma teoria incorreta da hereditariedade sugeria que as características genéticas eram transmitidas unicamente pelo pai.** Em apoio a essa teoria específica de herança uniparental, alguns pesquisadores, nos primórdios do uso da microscopia, alegavam terem sido capazes de detectar um ser humano completamente formado encolhido no interior da cabeça de espermatozoides.

nhar características específicas conforme elas são passadas (ou não) de pais para filhos. É necessário também que as características em questão apresentem algum grau de variabilidade. Se todos os pais de olhos azuis dão origem apenas a filhos de olhos azuis, geração após geração, a determinação do padrão de herança da cor azul dos olhos seria impossível por meio da análise dessas famílias.

Graças aos mecanismos da meiose que descrevemos, o sexo fragmenta conjuntos de informação genética estabelecidos, reorganiza os alelos sob novas configurações e, dessa maneira, gera indivíduos com características diferentes. Assim, não é de se estranhar que os estudos da herança via reprodução sexual tenham fornecido as primeiras informações essenciais para a compreensão dos mecanismos que definem os padrões de herança.

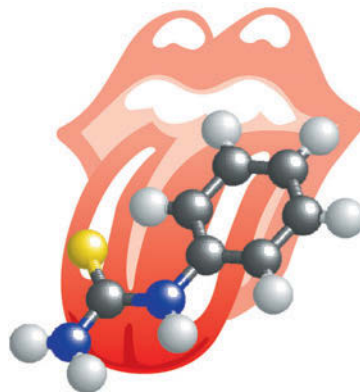
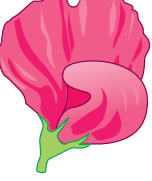
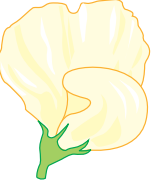
Seres humanos, assim como outras espécies, exibem características simples que podem ser seguidas de uma geração para a outra – como o fato de um indivíduo possuir lóbulos das orelhas grudados ou soltos, ou a capacidade de distinguir determinados cheiros ou sabores (**Figura 19-17**). No entanto, o tamanho de nossas famílias é reduzido, e o desenvolvimento humano é tão lento que são necessários 40 anos para que a progênie de apenas duas gerações seja analisada. Assim, seres humanos não representam um bom material experimental para os geneticistas.

As leis da herança genética foram então descobertas em espécies fáceis de cruzar e que produziam uma prole bastante numerosa. Gregor Mendel, o pai da genética, escolheu as ervilhas para seus estudos, mas experimentos similares podem ser realizados com moscas-das-frutas, nematódeos, cachorros, gatos ou quaisquer outros animais ou plantas que apresentem características de interesse. Atualmente sabemos que as mesmas leis básicas de herança são aplicáveis para todos os organismos de reprodução sexuada, de leveduras microscópicas a seres humanos, passando pelas ervilhas.

Nesta seção, descreveremos aa bases da herança genética em organismos de reprodução sexuada. Veremos como o comportamento dos cromossomos durante a meiose – sua segregação nos gametas, os quais a seguir se unem, de forma aleatória, para a formação de uma prole geneticamente distinta e característica – explica as leis da herança genética derivadas dos experimentos. Como primeiro passo, discutiremos como Mendel, por meio do cruzamento de ervilhas no jardim de seu mosteiro, desvendou essas leis no século XIX.

Mendel escolheu para seu estudo características que são herdadas de forma distinta

Quando desenvolvemos o desenho experimental direcionado a um questionamento científico, a seleção do organismo adequado é uma etapa crucial. Mendel escolheu plantas de ervilha para desenvolver seus estudos. Ervilhas apresentam cultivo fácil e rápido, e um grande número de plantas pode ser cultivado em um pequeno espaço – como é o caso de um jardim de abadia. Além disso, Mendel podia controlar os cruzamentos. Cada flor de uma planta de ervilhas contém tanto estruturas masculinas quanto femininas, e, se deixadas livres, essas plan-

Figura 19-17 **Algumas pessoas sentem esse sabor, outras, não.** A capacidade de perceber o sabor do produto químico feniltiocarbamida (PTC) é controlada por um único gene. Apesar de os geneticistas saberem desde a década de 1930 que a insensibilidade ao PTC é herdada de forma mendeliana, os pesquisadores só foram capazes de identificar o gene responsável por essa característica – um gene que codifica um receptor para o sabor amargo – em 2003. Pessoas insensíveis produzem uma proteína receptora de PTC que contém substituições de aminoácidos que, se imagina, reduzem a atividade da proteína.

tas normalmente apresentam autofecundação. Mendel descobriu que poderia realizar polinizações cruzadas nas ervilhas por meio da remoção das estruturas masculinas imaturas de uma flor seguida da fecundação da planta emasculada com espermatozoides (pólen) de outra planta. Assim, Mendel poderia ter certeza da ascendência de cada planta de ervilhas que ele examinava.

Tão importante para os objetivos de Mendel quanto as características anteriormente citadas é o fato de existirem diversas linhagens de plantas de ervilha. Por exemplo, uma linhagem de ervilhas apresenta flores púrpuras, ao passo que outra apresenta flores brancas. Uma variedade produz ervilhas lisas, ao passo que outra produz ervilhas rugosas. Mendel escolheu para estudar conjuntos de características – como a cor das flores e o formato das sementes – que eram distintas, facilmente observáveis e, o que foi mais importante, eram herdadas de forma distinta (**Figura 19-18**). Em outras palavras, as plantas possuíam ou flores púrpuras ou flores brancas – sem intermediários.

Mendel foi capaz de descartar teorias alternativas de herança genética

Os experimentos de cruzamento realizados por Mendel foram bastante diretos e simples. Ele partiu de linhagens de plantas de reprodução sexuada obrigatória, geneticamente puras. Quando plantas de reprodução sexuada obrigatória sofrem autopolinização, toda a sua progênie apresenta a mesma característica. Se ele estivesse estudando a coloração da semente, por exemplo, poderia usar plantas de ervilhas amarelas que sempre dessem origem a uma prole de ervilhas amarelas e plantas de ervilhas verdes que sempre dessem uma prole com ervilhas verdes.

A abordagem diferencial de Mendel consistiu na observação de uma única característica por vez. Seus antecessores haviam trabalhado com organismos como um todo que apresentavam diversidade em muitas características, fazendo com que sempre estivessem complicados na tentativa de caracterizar uma prole cuja aparência apresentava uma diversidade em tal nível que os indivíduos da prole não podiam ser facilmente comparados a seus parentais. Em um típico experimento, Mendel utilizou duas dessas linhagens puras e promoveu polinização cruzada. Ele então registrou a herança da característica selecionada na próxima geração. Por exemplo, Mendel cruzou plantas produtoras de ervilhas amarelas com plantas produtoras de ervilhas verdes. Nesse caso, ele descobriu que a prole

Figura 19-18 Mendel estudou sete diferentes características herdadas de modo distinto. Para cada característica, as plantas apresentam uma ou outra forma. Em outras palavras, uma planta específica de ervilhas pode produzir ervilhas amarelas ou verdes, mas não é capaz de produzir ervilhas de coloração intermediária. Como veremos a seguir, uma das variantes da característica é dominante, e a outra é recessiva.

Figura 19-19 Um grupo de experimentos simples revelou a natureza distinta da hereditariedade. Plantas de uma linhagem pura, produtora de ervilhas verdes, cruzadas com plantas de uma linhagem pura produtora de ervilhas amarelas sempre produzem prole com ervilhas amarelas. No entanto, como ilustrado, quando plantas dessa prole (as plantas F_1) são cruzadas entre elas ou são autofecundadas, 25% da progênie resultante produz ervilhas verdes.

híbrida resultante, denominada primeira filiação, ou geração F_1, era completamente composta por ervilhas amarelas (**Figura 19-19**). Um resultado similar foi observado para cada uma das características que haviam sido escolhidas: os híbridos F_1 se assemelhavam a apenas um de seus dois parentais.

A partir desse experimento com plantas de ervilhas produtoras de sementes amarelas e verdes, Mendel pode concluir que a coloração da semente não era transmitida por mistura. Se assim o fosse, todas as ervilhas da geração F_1 deveriam apresentar uma coloração amarelo-esverdeada. Uma análise superficial poderia indicar que a teoria de herança uniparental, a qual postulava que apenas um dos parentais sempre determinaria as características da prole, estava correta. Se Mendel tivesse interrompido aqui seus trabalhos – observando apenas a geração F_1 –, ele teria desenvolvido ideias errôneas sobre a natureza da hereditariedade. Felizmente, Mendel levou seus experimentos de cruzamento ao passo seguinte: cruzou as plantas da geração F_1 umas às outras – ou permitiu sua autofertilização – e examinou os resultados.

Os experimentos de Mendel foram os primeiros a revelar a natureza distinta da herança

Os experimentos subsequentes de Mendel com as plantas híbridas F_1 foram elaborados para responder a uma questão específica: o que havia acontecido com as características, como, por exemplo, as ervilhas verdes, que desapareceram na geração F_1 (ver Figura 19-19)? Haviam sido as plantas parentais que produziam ervilhas verdes, de algum modo, incapazes de contribuir geneticamente para a sua prole? Para descobrir, Mendel permitiu que as plantas F_1 sofressem autofecundação. Se a característica para produção de ervilhas verdes, por exemplo, tivesse sido perdida, então as plantas F_1 seriam capazes de produzir apenas ervilhas amarelas na próxima geração, F_2. Ele utilizou um grande número amostral e manteve um controle detalhado de seus resultados. Ele descobriu que a "característica desaparecida" reaparecia: apesar de três quartos da prole de uma geração F_2 serem compostos por ervilhas amarelas, um quarto era composto por ervilhas verdes (ver Figura 19-19).

O resultado definitivamente eliminou a teoria de herança por mistura. Simplesmente era impossível explicar na teoria por mistura como o cruzamento entre uma planta amarela com outra planta amarela originaria plantas com sementes verdes. Além disso, os dados deram a Mendel uma dica a respeito do que estaria acontecendo. Apesar de a característica relativa à produção de ervilhas verdes desaparecer temporariamente na geração F_1, ela reaparecia na geração F_2. Isso significava que pelo menos uma parcela das plantas da F_1 ainda abrigava um fator que codificava para ervilhas verdes: ele apenas estava de alguma forma silenciado. Mendel foi capaz de observar esse mesmo tipo de comportamento em cada uma das outras seis características que ele examinou.

Para explicar essas observações, Mendel fez a seguinte proposta: a herança genética de características é governada por fatores hereditários (atualmente denominados genes), e esses fatores atuam como partículas distintas que permanecem isoladas, em vez de sofrerem mistura. Além disso, ele sugeriu que os genes apresentariam versões alternativas, as quais seriam responsáveis pela diversidade vista em características hereditárias. O gene que definia a coloração da semente, por exemplo, existia em duas "versões": uma que direcionava a produção de ervilhas amarelas e outra que produzia as verdes. Tais versões alternativas de um gene são atualmente denominadas **alelos**, e o conjunto completo de alelos de um dado indivíduo – sua composição genética – é denominado **genótipo**.

Mendel imaginou que, para cada característica, uma planta deveria herdar duas cópias, ou alelos, de cada gene – uma de sua mãe e uma de seu pai. As linhagens parentais de reprodução obrigatória, ele teorizou, possuíam, cada uma, um par de alelos idênticos – as plantas de ervilhas amarelas possuíam dois alelos para ervilhas amarelas, e as plantas de ervilhas verdes possuíam dois alelos para ervilhas verdes. Um indivíduo que possui dois alelos idênticos é chamado de **homozigoto** para essa característica. As plantas híbridas F_1, por outro lado,

haviam recebido dois alelos diferentes – um que determinava ervilhas amarelas, e outro, ervilhas verdes. Essas plantas eram **heterozigotas** para a característica de interesse.

A aparência, ou **fenótipo**, de uma planta depende de quais versões de cada alelo ela tem. Para explicar o desaparecimento de uma das características na geração F_1, Mendel supôs que, para qualquer par de alelos, um seria *dominante*, e o outro seria *recessivo* ou silenciado. O alelo dominante, sempre que presente, seria responsável pela determinação do fenótipo da planta. No caso da cor da semente, o alelo que determina ervilhas amarelas é dominante; o alelo para ervilhas verdes é recessivo.

Uma consequência importante da heterozigosidade, e da dominância e da recessividade, é que nem todos os alelos presentes em um indivíduo podem ser detectados por meio de seu fenótipo. Seres humanos possuem aproximadamente 25.000 genes, e cada um de nós é heterozigoto para a grande maioria desses. Assim, todos possuímos uma grande quantidade de informação genética que permanece escondida em nosso genótipo pessoal, mas que pode tornar-se aparente em gerações futuras.

Cada gameta carrega um único alelo para cada característica

A teoria de Mendel – para cada gene, um indivíduo herdará uma cópia de sua mãe e uma cópia de seu pai – nos leva a algumas questões organizacionais. Se um organismo possui duas cópias de cada gene, como ele transmite apenas uma cópia para sua progênie? E como esses conjuntos de genes se reencontram e se unem novamente na prole resultante?

Mendel postulou que, quando os espermatozoides e os óvulos eram formados, as duas cópias de cada gene presentes em um parental seriam separadas, ou segregariam, de tal forma que cada gameta receberia apenas um alelo para cada característica. Assim, cada óvulo e cada espermatozoide (pólen) recebem apenas um alelo para a cor da semente (ou amarelo ou verde), um alelo para o formato da semente (lisa ou rugosa), um alelo para a coloração da flor (púrpura ou branca) e assim por diante. Durante a fecundação, o espermatozoide que possui um dos alelos se une a um óvulo que também possui um dos alelos, restabelecendo um total de duas cópias do gene para cada característica, que estarão presentes no óvulo fertilizado ou zigoto. Qual espermatozoide se unirá a qual óvulo durante o processo de fecundação é algo devido absolutamente ao acaso.

Esse princípio da herança foi descrito na primeira lei de Mendel – a **lei da segregação** – a qual postula que os dois alelos para uma dada característica se separam (ou segregam) durante a formação dos gametas e que eles se reúnem aleatoriamente, um derivado de cada parental, na fecundação. De acordo com a lei da segregação, as plantas híbridas F_1 com ervilhas amarelas produzem duas classes de gametas: a metade dos gametas herdará o alelo para ervilhas amarelas, e a metade restante herdará o alelo para ervilhas verdes. Quando as plantas híbridas sofrerem autopolinização, essas duas classes de gametas irão se unir aleatoriamente. Desse modo, um óvulo que contém um alelo para ervilhas verdes possui uma chance igual de ser fertilizado tanto por um pólen que possui um alelo para ervilhas verdes quanto por um pólen que possui um alelo para ervilhas amarelas. A mesma lógica se aplica para óvulos que contêm um alelo para ervilhas amarelas. Consequentemente, existem quatro diferentes combinações de alelos que podem resultar na prole F_2 (**Figura 19-20**). Um quarto das plantas F_2 receberá dois alelos que determinam ervilhas verdes; essas, obviamente, originarão ervilhas verdes. Um quarto das plantas receberá dois alelos que determinam ervilhas amarelas e produzirá ervilhas amarelas. No entanto, metade das plantas herdará um alelo para ervilhas verdes e um alelo para ervilhas amarelas. Visto que o alelo para ervilhas amarelas é dominante, essas plantas – assim como seus parentais heterozigotos F_1 – produzirão ervilhas amarelas. No cômputo geral, três quartos da prole produzirão ervilhas amarelas e um quarto produzirá ervilhas verdes. Assim, a lei da segregação de Mendel é capaz de explicar a relação 3:1 que ele observou nas plantas da geração F_2.

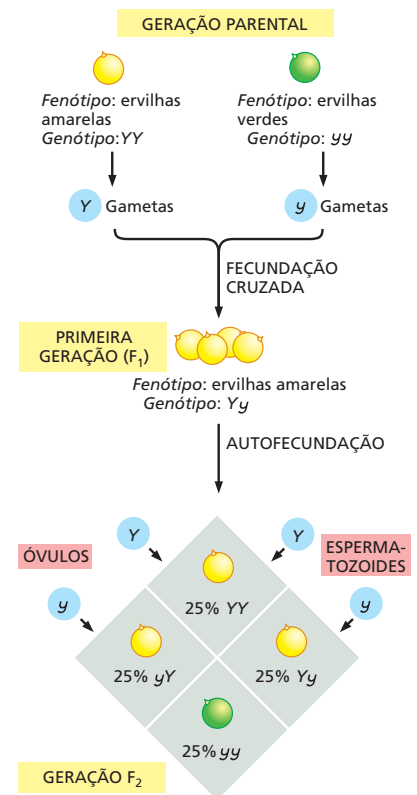



Figura 19-20 Plantas parentais produzem gametas contendo, cada um, um alelo para cada característica; o fenótipo da prole depende da combinação dos alelos recebidos. Nessa figura, podemos observar tanto o genótipo quanto o fenótipo das plantas de ervilha que foram cruzadas na Figura 19-19. As plantas da linhagem pura de ervilhas amarelas produzem apenas gametas que contêm *Y*, ao passo que as plantas da linhagem pura de ervilhas verdes produzem apenas gametas que contêm *y*. Sua prole, que produz ervilhas amarelas, apresenta genótipo *Yy*. Quando essas plantas híbridas são cruzadas umas com as outras, 75% da prole produz ervilhas amarelas, e 25% da prole produz ervilhas verdes. O quadro sombreado, na parte inferior da figura, denominado diagrama de Punnett em homenagem a um matemático britânico seguidor das ideias de Mendel, permite traçar a separação dos alelos durante a formação dos gametas e predizer as combinações que ocorrerão durante a fecundação. De acordo com o sistema idealizado por Mendel e ainda atualmente em uso, letras maiúsculas representam alelos dominantes, e letras minúsculas representam alelos recessivos.

A lei da segregação de Mendel se aplica a todos os organismos de reprodução sexuada

A lei da segregação de Mendel forneceu uma explicação para todos os dados referentes às características examinadas nas ervilhas. Ele também foi capaz de replicar seus dados em experimentos com milho e feijões, mas as regras que governam a herança genética não estão limitadas à reprodução de vegetais. O conceito de gene, estabelecido por Mendel, e sua lei de segregação, podem ser generalizados a todos os organismos de reprodução sexuada, inclusive para humanos.

Consideraremos agora um fenótipo humano que reflete a ação de um único gene. A principal forma de albinismo – albinismo Tipo II – é uma condição rara, herdada de forma recessiva em diferentes animais, inclusive em humanos. Em outras palavras, assim como as plantas de ervilha que produzem sementes verdes, indivíduos albinos são homozigotos para o alelo recessivo (*a*) de um determinado gene. Assim, seu genótipo é *aa*. O alelo dominante (*A*) do gene codifica uma enzima envolvida na produção de melanina, o pigmento responsável pela maior parte da coloração marrom e preta presente nos cabelos, na pele e na retina dos olhos. O alelo recessivo codifica uma versão dessa enzima que é menos ativa ou totalmente inativa. Na ausência dessa enzima, os albinos possuem cabelos brancos, pele branca e pupilas que se apresentam rosadas, pois a falta de coloração revela a cor vermelha da hemoglobina presente nos vasos sanguíneos da retina.

Se um homem albino Tipo II (genótipo *aa*) tem filhos com uma mulher albina Tipo II (cujo genótipo também é *aa*), todas as crianças serão albinas (*aa*). No entanto, imagine agora que um homem não albino se case com uma mulher albina e tenha filhos. (Assumiremos que o homem é homozigoto para o alelo dominante *A*; o albinismo é bastante raro, e se nunca alguém em sua família apresentou essa condição, o palpite sobre seu genótipo é provavelmente válido.) Todos os filhos desse casal deverão apresentar uma pigmentação normal – ou seja, nenhum será albino. Esse resultado reflete os cruzamentos de Mendel entre as plantas de linhagens puras de ervilha. O pai contribuirá com um alelo dominante *A* para cada gameta, e a mãe contribuirá com um alelo recessivo *a*. A prole, com genótipo *Aa*, deverá sempre apresentar o fenótipo dominante (**Figura 19-21**). Se uma dessas crianças, algum dia, encontrar um indivíduo com genótipo similar (um homem ou mulher que possua algum dos parentais albino) e der início a uma família, poderemos imaginar que seus descendentes diretos seguirão o padrão visto por Mendel na geração F_2: em média, para cada três crianças com pigmentação normal, haverá uma criança albina. Ou, considerando cada criança individualmente, haverá uma chance de 25% de que cada criança receba dois alelos recessivos.

No entanto, os seres humanos em geral não possuem grupos familiares suficientemente grandes para que possamos observar com exatidão as frequências mendelianas. (Mendel chegou a suas conclusões após o cruzamento e a análise de milhares de ervilhas na maioria de seus cruzamentos.) Os geneticistas interessados em analisar a herança genética de características específicas em humanos tentam contornar esse problema trabalhando com um grande número de famílias ou analisando várias gerações de algumas famílias numerosas. Para manter o controle desse tipo de informação e auxiliar na determinação do padrão da herança genética, os geneticistas preparam um ***pedigree*** (ou heredograma) – um diagrama que mostra o fenótipo de cada um dos membros da família, em relação à característica de interesse A **Figura 19-22** nos apresenta um exemplo de heredograma, ilustrando uma importante consequência prática das leis de Mendel: ela nos mostra como casamentos entre primos-irmãos (primos em primeiro grau) apresentam um risco aumentado de dar origem a crianças homozigotas para uma mutação recessiva deletéria e, consequentemente, de permitir a expressão do fenótipo mutante.

Alelos para diferentes características segregam de forma independente

Mendel deliberadamente simplificou o problema da herança genética ao realizar cruzamentos mono-híbridos – experimentos de cruzamentos que visavam à análise da herança de uma única característica por vez. Ele então continuou seus

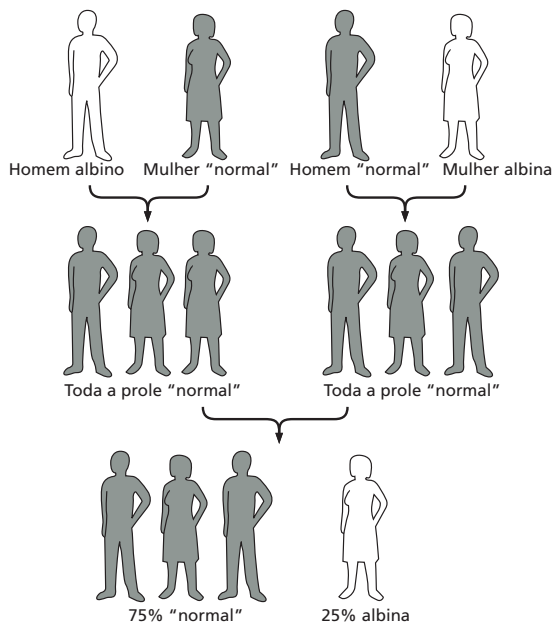
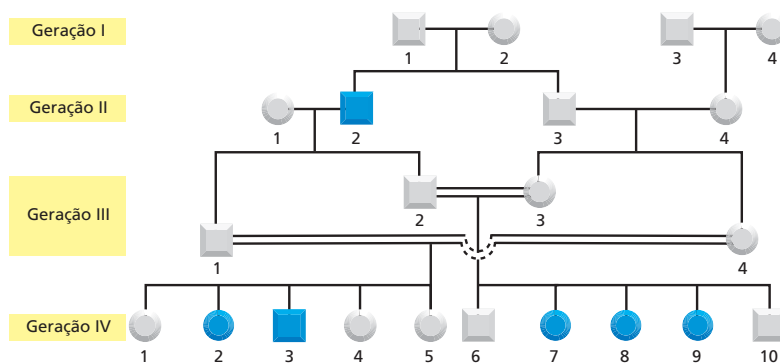



Figura 19-21 As leis da segregação de Mendel se aplicam a qualquer organismo de reprodução sexuada. Aqui apresentamos a herança do albinismo tipo II, uma característica recessiva associada a um único gene em humanos.

estudos com ervilhas, dessa vez analisando simultaneamente a herança de duas ou mais características não relacionadas de forma aparente.

Na situação mais simples desse tipo de experimento, um *cruzamento di-híbrido*, Mendel seguia a herança de duas características simultaneamente – cor das sementes e formato das sementes, por exemplo. No caso da cor das sementes, já nos foi dito que ervilhas amarelas são dominantes sobre ervilhas verdes. No caso do formato da semente, ervilhas redondas (ou lisas) são dominantes sobre ervilhas rugosas. Mendel se questionava sobre o que aconteceria quando plantas que diferiam em ambas as características estudadas fossem cruzadas. Novamente, ele deu início a seus estudos com linhagens parentais puras: a linhagem dominante produzia ervilhas lisas amarelas (seu genótipo era *YYRR*), e a linhagem recessiva produzia ervilhas verdes rugosas (*yyrr*). Uma das possibilidades é que ambas as características, cor e formato das sementes, fossem transmitidas dos parentais para sua prole como se estivessem ligadas em um mesmo bloco. Em outras palavras, as plantas sempre produziriam ou ervilhas lisas e amarelas ou verdes e rugosas. A outra possibilidade é que a coloração e a forma das sementes poderiam ser herdadas de forma independente uma da outra, o que significaria que em algum momento apareceriam plantas que produziriam uma nova combinação das características – ervilhas amarelas rugosas ou ervilhas verdes lisas.

Mendel realizou os cruzamentos entre as plantas e manteve anotações cuidadosas de seus resultados. Como esperado, a geração F_1 apresentou um único fenótipo: todas as plantas produziram ervilhas amarelas e lisas. No entanto, essa situação ocorreria independentemente de os alelos parentais estarem ou não

Figura 19-22 Um heredograma ilustra o risco de casamentos entre primos em primeiro grau. Aqui é apresentado um heredograma real de uma família na qual está presente uma mutação recessiva rara causadora de surdez. De acordo com o convencionado, os *quadrados* representam indivíduos do sexo masculino, e os *círculos* representam mulheres. Os membros da família que possuem o fenótipo de surdez estão indicados por um símbolo preenchido (em *azul*), e os indivíduos não afetados estão representados por símbolos vazios (em *branco*). Uma linha simples horizontal entre um homem e uma mulher representa um cruzamento entre indivíduos não aparentados, e uma linha dupla horizontal representa um cruzamento entre parentes consangüíneos. A progênie de cada cruzamento está ilustrada na linha abaixo do respectivo cruzamento, em ordem de nascimento, da esquerda para a direita.

Indivíduos pertencentes à mesma geração estão numerados sequencialmente da esquerda para a direita para possibilitar sua identificação. Na terceira geração desse heredograma, por exemplo, o indivíduo 2, um homem não afetado, casa com uma prima em primeiro grau, indivíduo 3, também não afetada. Três de seus cinco filhos (indivíduos 7, 8 e 9, na quarta geração) apresentam surdez. Também na terceira geração, o indivíduo 1, irmão do indivíduo 2, também se casa com uma prima em primeiro grau (indivíduo 4, irmã de 3). Dois de seus cinco filhos apresentam surdez. (Adaptada de Z.M. Ahmed *et al.*, *BMC Med. Genet.* 5:24, 2004. Com permissão de BMC Medical Genetics.)

ligados. Quando essas plantas F_1 sofreram autofertilização, os resultados mostraram claramente que cada característica era herdada de forma independente; ou seja, os dois alelos para a cor da semente segregavam independentemente dos dois alelos para o formato da semente, produzindo quatro diferentes fenótipos de ervilhas: amarelas lisas, amarelas rugosas, verdes lisas e verdes rugosas (**Figura 19-23**). Mendel testou as sete características que havia selecionado para seus estudos com ervilhas em diferentes combinações de duas a duas e sempre observou uma frequência fenotípica característica de 9:3:3:1 na geração F_2. A segregação independente de cada par de alelos durante a formação dos gametas é conhecida como segunda lei de Mendel – a **lei do arranjo independente**.

O comportamento dos cromossomos durante a meiose fundamenta as leis da herança de Mendel

Até o momento, mencionamos alelos e genes como se fossem entidades etéreas, sem matéria. Como biólogos, no entanto, estamos interessados na hereditariedade não somente sob a forma de uma coleção de frequências e probabilidades matemáticas – a probabilidade de uma planta de ervilhas possuir flores púrpuras

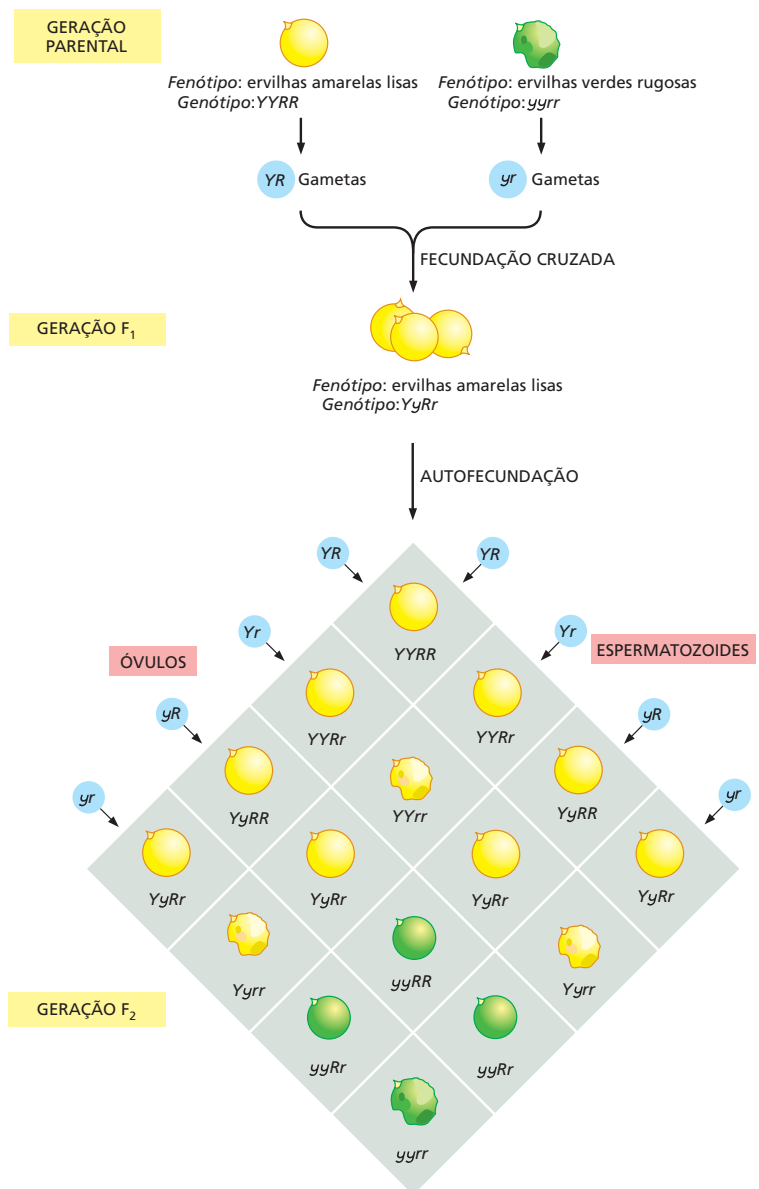



Figura 19-23 Um cruzamento di-híbrido demonstra que alelos para diferentes características podem segregar de forma independente. Quando alelos segregam independentemente uns dos outros, serão encontrados nos gametas sob todas as diferentes combinações possíveis. Assim, é igualmente provável encontrar o alelo *Y* com o alelo *R* ou com o alelo *r* durante a formação dos gametas; o mesmo raciocínio é verdadeiro para o alelo *y*. Dessa forma, quatro classes de gametas podem ser produzidas em proporções praticamente iguais *YR*, *Yr*, *yR* e *yr*. Quando esses gametas são combinados aleatoriamente para a produção da geração F_2, os fenótipos de ervilha resultantes são amarela lisa, amarela rugosa, verde lisa e verde rugosa em uma proporção de 9:3:3:1.

ou a probabilidade de nascimento de uma criança albina. Queremos compreender como a hereditariedade trabalha no interior dos espermatozoides, dos óvulos e do zigoto resultante. Mendel assumiu que os genes estavam localizados nas células, mas ele não tinha ideia de que material os compunha ou de onde eles poderiam ser encontrados. Hoje sabemos que os "fatores" de Mendel – que denominamos genes – são transportados nos cromossomos, são distribuídos durante a formação dos gametas e novamente reunidos, sob novas combinações, nos zigotos, quando ocorre a fecundação. Dessa forma, os cromossomos fornecem a base física para as leis de Mendel. Como veremos a seguir, seu comportamento durante a meiose e a fecundação é perfeitamente adequado às leis de Mendel.

Ao longo da meiose, como discutimos, os homólogos de origem paterna e materna – e os genes que neles se localizam – formam pares e, a seguir, são separados um do outro no processo de sua distribuição para os gametas. Esses cromossomos homólogos conterão diferentes variantes – ou alelos – de diversos genes neles codificados. Considere, por exemplo, uma planta heterozigota para ervilhas amarelas (*Yy*). Durante a meiose, os cromossomos que carregam os alelos *Y* e *y* serão separados, dando origem a dois tipos de gametas haploides, aqueles que conterão o alelo *Y* e aqueles que conterão o alelo *y*. Sob autofecundação, esses gametas haploides se unirão aleatoriamente para produzir os indivíduos diploides da próxima geração – os quais serão *YY*, *Yy* ou *yy*. Os mecanismos meióticos que dirigem a separação dos alelos entre os gametas e a recombinação aleatória dos gametas na fecundação originam exatamente os resultados esperados pela aplicação das leis genéticas de Mendel.

Durante a meiose, cada conjunto de homólogos pareados se liga de forma independente ao fuso. Essa organização aleatória dos cromossomos sobre a placa metafásica está refletida na lei de Mendel da segregação independente, visto que genes em diferentes cromossomos serão herdados de forma independente. Apesar de cada gameta receber uma, e apenas uma, cópia de cada cromossomo, esse conterá, no final do processo, uma mistura aleatória dos homólogos de origem paterna e materna (ver Figura 19-13A).

A **Figura 19-24** esquematiza esse processo considerando uma planta de ervilha heterozigota tanto para a cor da semente (*Yy*) quanto para a forma da semente (*Rr*). O par de cromossomos que carrega os alelos para a cor da semente se ligará ao fuso meiótico sob uma determinada orientação. Se o homólogo que contém o alelo *Y* ou o homólogo que contém o alelo *y* será capturado por microtúbulos que partem de um ou de outro polo é uma questão que depende do posicionamento do bivalente no momento da ligação (ver Figura 19-24). A mesma situação ocorrerá em relação ao par de cromossomos que carrega os alelos relativos à forma da semente. Assim, o fato de o gameta resultante receber uma combinação de alelos *YR*, *Yr*, *yR* ou *yr* é totalmente dependente do posicionamento de cada par de cromossomos no fuso meiótico quando ocorre sua captura, situação essa que apresenta o mesmo grau de aleatoriedade que um jogo de cara ou coroa.

A frequência de recombinação pode ser usada para determinar a ordem dos genes

Mendel estudou sete características codificadas por sete genes, e cada característica segregava independentemente das demais. Hoje sabemos que a maioria desses genes se encontra em cromossomos diferentes, o que facilmente explica a distribuição aleatória que ele observou. No entanto, a observação de Mendel de que diferentes genes se distribuem de forma independente não requer necessariamente que esses se encontrem em cromossomos diferentes. Genes que estão posicionados a uma distância suficientemente grande, sobre um mesmo cromossomo, também apresentarão uma distribuição independente em virtude da recombinação que ocorre durante a meiose. Como discutido, quando os cromossomos duplicados formam bivalentes e se alinham sobre o fuso metafásico, os homólogos de origem materna e paterna sofrem, tipicamente, vários eventos de recombinação e, por consequência, trocam material genético. Tais eventos de *crossing-over* podem separar alelos que estavam originalmente sobre o mesmo cromossomo, fazendo com que segreguem para gametas diferentes (**Figura 19-25**). Atualmente sabemos,

Figura 19-24 A separação de cromossomos durante a meiose explica as leis de Mendel da segregação e do arranjo independentes. Aqui mostramos o arranjo independente para os alelos de cor da semente, amarelo (*Y*) e verde (*y*), e formato da semente, lisa (*R*) e rugosa (*r*), que correspondem a dois genes localizados em cromossomos diferentes. Por uma questão de simplificação, a figura está desenhada ilustrando um caso onde não há recombinação entre os homólogos materno e paterno; o resultado – arranjo independente – é o mesmo (visto que os genes de cor e formato da semente estão em cromossomos diferentes) que ocorreria na presença de recombinação.

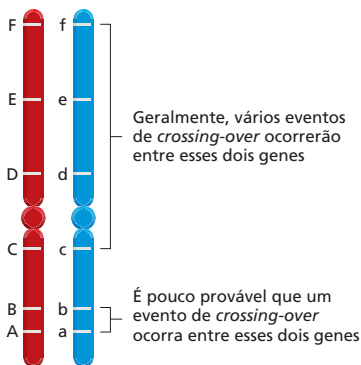
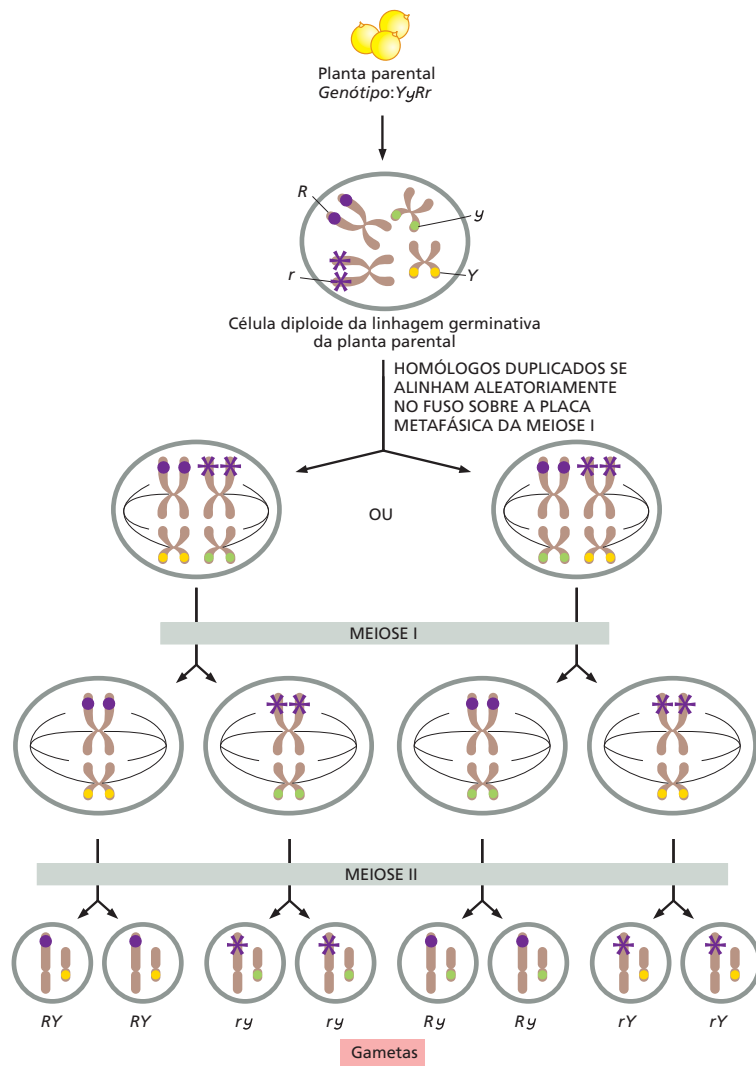



Figura 19-25 Genes que estão suficientemente distantes sobre um mesmo cromossomo podem segregar independentemente. Visto que vários eventos de *crossing-over* ocorrem aleatoriamente sobre cada cromossomo durante a prófase da meiose I, dois genes sobre o mesmo cromossomo obedecerão à lei do arranjo independente de Mendel se estiverem suficientemente distantes um do outro. Assim, por exemplo, existe uma alta probabilidade que recombinações ocorram entre as regiões *C/c* e *F/f*, o que torna igualmente possível que um gameta carregue o alelo *F* junto a um alelo *C* ou junto a um alelo *c*. Em contraste, os genes *A/a* e *B/b* estão muito próximos e, portanto, existe apenas uma pequena chance que uma recombinação ocorra entre eles: dessa forma, é mais provável que o alelo *A* seja herdado junto com o alelo *B*, e o alelo *a* com o alelo *b*. A partir da frequência de recombinação, é possível estimar a distância entre os genes.

por exemplo, que os genes para formato da semente e da cor da vagem, analisados por Mendel, estão posicionados sobre o mesmo cromossomo, mas, visto que se encontram bastante distantes, segregam de maneira independente.

Naturalmente, nem todos os genes são herdados de forma independente como estabelece a segunda lei de Mendel. Se os genes estão posicionados muito próximos um do outro sobre um cromossomo, eles potencialmente serão herdados em bloco, como uma unidade. Por exemplo, em virtude da sua proximidade, os genes associados ao daltonismo e à hemofilia em humanos são caracteristicamente herdados em bloco. Através da medida de frequência de co-herdabilidade dos genes, os pesquisadores podem determinar se dois genes específicos residem sobre o mesmo cromossomo e, caso essa situação ocorra, qual a distância que os separa. Essas medidas de *ligação genética* foram utilizadas para mapear a posição relativa dos genes sobre os cromossomos de diferentes organismos. Esses *mapas genéticos* foram essenciais para o isolamento e a caracterização de genes cuja disrupção mediada por mutações é responsável por doenças genéticas em humanos, como o caso da fibrose cística.

Mutações em genes podem causar a perda ou o ganho de funções

As mutações podem ser classificadas em várias categorias básicas (**Figura 19-26**). Alterações que reduzem ou eliminam a atividade de um gene são denominadas

Figura 19-26 Mutações gênicas podem afetar o produto proteico de diferentes formas. Nesse exemplo, a proteína de tipo selvagem possui uma função celular específica, salientada pelos pequenos *raios vermelhos*. Nesse desenho, são ilustradas mutações que eliminam essa função, que a tornam hiperativa, ou que a tornam sensível a altas temperaturas. Uma *mutação sensível à temperatura* é um tipo de *mutação condicional*: o alelo produz proteína ativa sob uma dada condição (25°C, no exemplo), mas produz proteína inativa sob outras condições. No exemplo, a proteína possui uma substituição de um aminoácido (em *vermelho*) que a impede de realizar o dobramento adequado a 37°C, mas que permite seu dobramento a 25°C.

mutações de perda de função. Um organismo que recebe duas cópias de um alelo de perda de função geralmente apresentará um fenótipo mutante – aquele que difere do fenótipo mais comum ou "normal". O heterozigoto que possui um alelo mutante e um alelo do tipo selvagem em geral produz uma quantidade suficiente do produto gênico ativo para o funcionamento normal e mantém o fenótipo do tipo selvagem (**Painel 19-1**, p. 674). Assim, as mutações de perda de função são, geralmente, recessivas, pois – no caso da maioria dos genes – a redução da quantidade presente de produto gênico para a metade ainda permite que a célula funcione normalmente.

Como exemplo, no caso das ervilhas rugosas de Mendel, o gene que define o formato da semente codifica uma enzima que auxilia a conversão de açúcares em moléculas ramificadas de amido. O alelo selvagem dominante, *R*, produz a enzima ativa; o alelo mutante recessivo, *r*, não codifica enzima ativa. Visto não possuírem essa enzima, as plantas homozigotas para o alelo mutante, *rr*, contêm mais açúcar e produzem menos amido do que as plantas que contêm o alelo dominante *R*, o que lhes confere uma aparência rugosa. (As ervilhas congeladas disponíveis nos supermercados são mutantes rugosos, apesar de o alelo que elas possuem não ser necessariamente o mesmo usado por Mendel em seus experimentos.)

Outra classe de alelos mutantes produz proteínas que são super ativas ou que são ativas em circunstâncias inadequadas. Essas **mutações de ganho de função** são geralmente dominantes. Por exemplo, como vimos no Capítulo 16, certas mutações no gene que codifica Ras, uma proteína envolvida no controle do crescimento e da proliferação celular, dão origem a uma forma da proteína que é constitutivamente ativa e que, por consequência, eclipsa o alelo do tipo selvagem. A proteína Ras mutante pode estimular a divisão celular inadequadamente, mesmo na ausência de qualquer sinal para crescimento. Aproximadamente 30% de todos os cânceres em humanos contêm mutações dominantes ativadoras no gene *Ras*.

QUESTÃO 19-3

Imagine que cada cromossomo sofre apenas um evento de *crossing-over* em cada cromátide durante cada meiose. Como seriam co-herdadas características que são determinadas por genes que se encontram em extremidades opostas, sobre um mesmo cromossomo, quando comparado à co-herança observada para genes situados em dois cromossomos distintos? Compare essa situação com o observado na vida real.

Cada um de nós possui vários alelos mutantes recessivos potencialmente deletérios

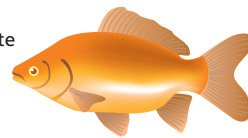
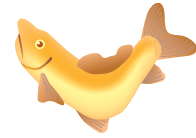
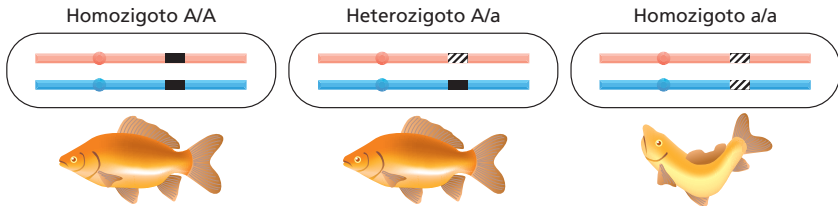
Como vimos no Capítulo 9, as mutações fornecem uma fonte de reserva para a atuação da evolução. As mutações podem alterar a adaptatibilidade de um organismo, tornando-o mais (ou menos) propenso a sobreviver e deixar progênie. A seleção natural determina quais dessas mutações serão preservadas. Aquelas alterações que conferem uma vantagem seletiva para um organismo tendem a se perpetuar, ao passo que aquelas que comprometem seriamente a capacidade de adaptação do organismo tendem a desaparecer.

A grande maioria das mutações ao acaso é neutra, não apresenta efeito no fenótipo, ou deletéria. Uma mutação deletéria que seja dominante – ou seja, uma mutação que exerça seus efeitos negativos mesmo quando presente em uma única cópia – será eliminada quase que imediatamente após seu surgimento: se um organismo mutante for incapaz de se reproduzir, a mutação que causa essa incapacidade será eliminada da população simultaneamente à morte do indivíduo mutante. No caso de mutações deletérias recessivas, a situação é um pouco mais complicada. Quando uma mutação desse tipo é gerada (por meio de uma alteração química na molécula de DNA, por exemplo), ela geralmente estará presente em uma única cópia, e o indivíduo que possuir essa mutação poderá dar origem a uma progênie tão numerosa quanto a progênie de qualquer outro indivíduo. Dentre a progênie do mutante original, vários indivíduos herdarão a cópia única mutada. Eles também serão saudáveis e bem adaptados; no entanto, quando cruzamentos entre eles e entre seus descendentes começarem a ocor-

PAINEL 19-1 Alguns princípios básicos de genética clássica

GENES E FENÓTIPOS

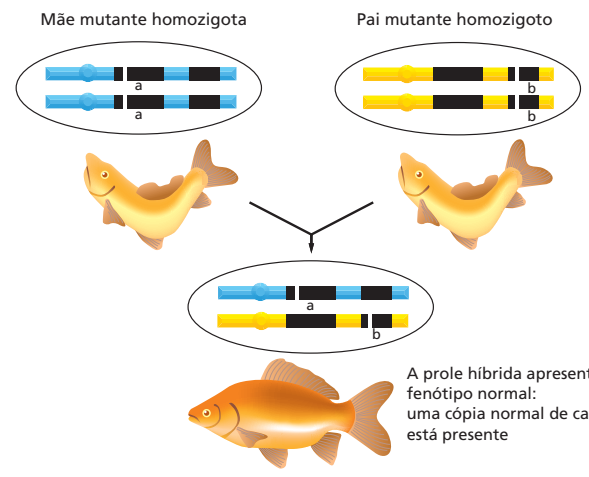
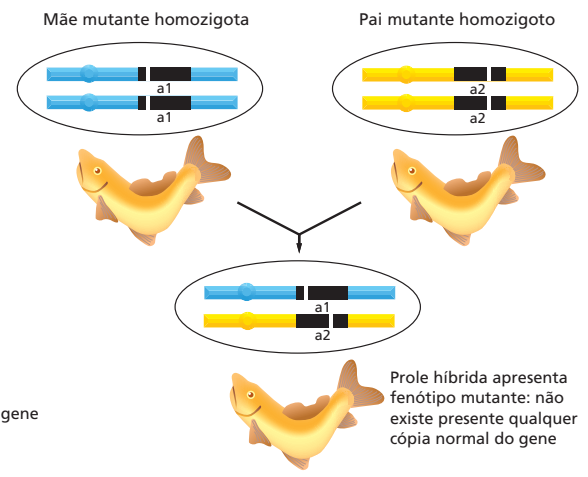
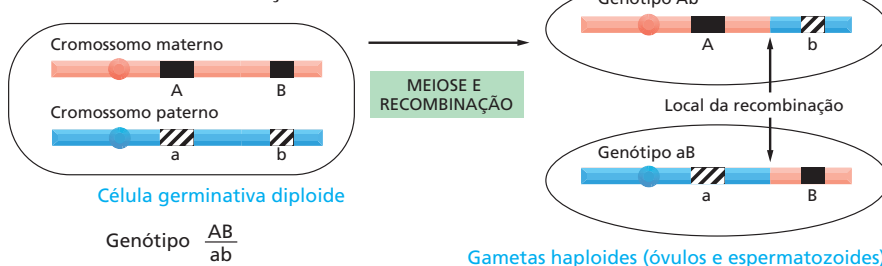
Gene: uma unidade funcional de herança, em geral correspondente a um segmento de DNA que codifica uma única proteína.

Genoma: o conjunto de sequências de DNA de um organismo.

o alelo A é dominante (em relação ao alelo a); o alelo a é recessivo (em relação ao alelo A)

No exemplo acima, o fenótipo do heterozigoto é igual ao de um dos homozigotos; nos casos em que o fenótipo do heterozigoto difere de ambos os homozigotos, os dois alelos são denominados codominantes.

DOIS GENES OU MAIS?

Dadas duas mutações que produzem o mesmo fenótipo, como podemos determinar se essas mutações se encontram sobre o mesmo gene? Se as mutações são recessivas (como frequentemente é o caso), a resposta pode ser encontrada por meio de um teste de complementação.

No tipo mais simples de teste de complementação, um indivíduo homozigoto para uma mutação é cruzado com um indivíduo homozigoto para a outra mutação. O fenótipo da prole pode responder à nossa questão.

MEIOSE E RECOMBINAÇÃO GENÉTICA

Quanto maior a distância entre dois lócus sobre um cromossomo, maior é a chance de eles serem separados por um *crossing-over* que ocorra em uma região qualquer entre eles. Se dois genes são dessa forma reorganizados em x% dos gametas, diz-se que eles estão separados em um cromossomo por uma distância de mapeamento genético de x unidades de mapa (ou x centimorgans).

rer, alguns indivíduos herdarão duas cópias do alelo mutante e apresentarão o fenótipo deletério.

Se esses indivíduos homozigotos forem incapazes de se reproduzir, duas cópias do alelo mutante serão eliminadas da população. Finalmente, será alcançado um equilíbrio, em que a taxa de geração de novas cópias do alelo por mutações recorrentes será equivalente à perda de cópias por acasalamento entre indivíduos homozigotos recessivos. Como consequência, diversas mutações recessivas deletérias estão presentes em uma população em frequências surpreendentemente altas, mesmo considerando-se que sejam raros os indivíduos que apresentam o fenótipo deletério. Assim, crianças com a forma mais comum de surdez hereditária (devida a uma mutação na proteína das junções comunicantes, ver Figura 20-29), representam um em cada 4.000 nascimentos; mas aproximadamente um a cada 30 indivíduos da população geral é portador de um alelo mutante de perda de função nesse gene.

A GENÉTICA COMO FERRAMENTA EXPERIMENTAL

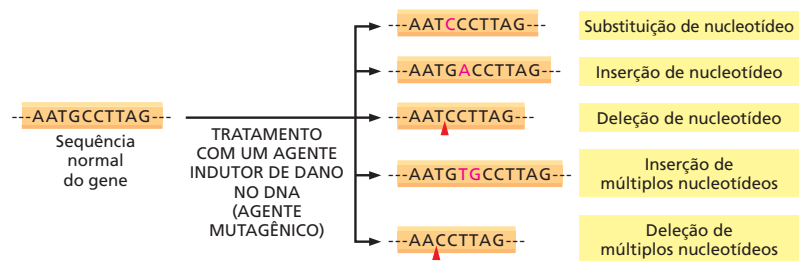
A compreensão de que os cromossomos são as estruturas celulares responsáveis pela transferência de nossos genes de uma geração à seguinte foi muito além da desmistificação das bases da herança genética. Ela uniu a genética a outras disciplinas: biologia celular, bioquímica, fisiologia e medicina. O fato de sabermos que os genes são as unidades da herança também permitiu que determinássemos que eles são formados de DNA, o que, por sua vez, permitiu novas descobertas. Por meio da análise e da manipulação de nosso DNA, podemos hoje começar a compreender como nossos genes atuam em conjunto para criar nosso fenótipo e como diferenças nesses genes são responsáveis pelas diferenças existentes entre indivíduos. Cada vez mais, o conhecimento da genética nos permite diagnosticar e tratar de forma mais eficiente as doenças humanas, bem como nos auxilia a desvendar nossas semelhanças e diferenças como indivíduos e como espécie.

Nesta seção, descreveremos a abordagem genética clássica para a identificação de genes e para a determinação de como eles influenciam o fenótipo de um organismo. O processo envolve a criação intencional de um grande número de organismos mutantes em laboratório e o uso de uma triagem genética para o isolamento, entre todos os indivíduos gerados, daqueles raros indivíduos que apresentarem o fenótipo de interesse. Essa *triagem genética* identifica os portadores de mutações nos genes que determinam o fenótipo em questão. Pela análise desses mutantes individuais e de sua progênie, podemos identificar e caracterizar os genes *per se* – e, como resultado disso, podemos caracterizar a cadeia de causa e efeito que une os genes ao fenótipo.

A tecnologia atual abriu vias adicionais que podem ser usadas para a identificação de genes que possuem funções importantes. No final desta seção, discutiremos como podemos analisar o DNA obtido a partir de populações humanas de diferentes partes do mundo, tanto para a obtenção de informações sobre a genética de doenças e de características complexas – aquelas que não são determinadas por um único gene – como para a obtenção de informações sobre a evolução de nossa espécie.

A abordagem clássica tem início com mutagênese aleatória

Antes do advento da tecnologia do DNA recombinante (apresentada no Capítulo 10), a maioria dos genes eram identificados por meio da observação dos processos que eram interrompidos quando o gene era mutado. Esse processo tem início com o isolamento de mutantes que apresentam uma aparência interessante ou incomum: moscas-das-frutas com olhos brancos ou asas recurvadas, por exemplo. Trabalhando a partir desses fenótipos, é possível determinar o genótipo do organismo. Essa abordagem genética clássica – a busca de fenótipos mutantes e o subsequente isolamento de genes responsáveis pelo fenótipo – é mais facilmente empregada em organismos que se reproduzem de forma rápida e que são passíveis de manipulação genética, como bactérias, leveduras, nematódeos e moscas-das-frutas.

Figura 19-27 Mutações podem ser causadas por diferentes alterações no DNA. Algumas categorias comuns estão ilustradas aqui. Diferentes agentes mutagênicos tendem a provocar diferentes tipos de alterações.

Apesar de mutantes espontâneos poderem eventualmente ser encontrados pela análise de populações extremamente grandes – milhares ou dezenas de milhares de organismos individuais –, o processo de identificação de mutantes de interesse pode ser desenvolvido de forma muito mais eficiente por meio da indução de mutações com agentes que provocam danos no DNA, denominados *agentes mutagênicos*. Diferentes agentes mutagênicos podem gerar diferentes tipos de alterações no DNA (Figura 19-27). Por meio do tratamento de organismos com agentes mutagênicos, uma quantidade extremamente grande de mutantes pode ser gerada de forma rápida e, a seguir, triada para a presença de um defeito específico de nosso interesse, como veremos logo adiante.

A mutagênese é uma ferramenta bastante poderosa para a identificação de genes e correlação desses com fenótipos em nematódeos e moscas; no entanto, essa abordagem, obviamente, não pode ser empregada para estudos em seres humanos. Diferente dos organismos citados, seres humanos não se reproduzem de forma rápida e também não podem ser intencionalmente tratados com agentes mutagênicos. Além disso, qualquer ser humano portador de um defeito sério em algum processo essencial, como a replicação de DNA, por exemplo, provavelmente morreria muito antes do nascimento.

Existem duas respostas principais para a questão de como estudar genes em seres humanos. Primeiro, visto que genes e funções gênicas são altamente conservadas ao longo da evolução, muito pode ser descoberto sobre genes humanos pelo estudo dos genes equivalentes em outros organismos que apresentem melhores condições para experimentação. Após a análise em modelos experimentais, os genes humanos correspondentes podem ser mais bem analisados em células humanas mantidas em cultura. Segundo, diversas mutações que não são necessariamente letais, como é o caso da mutação causadora de surdez antes discutida, surgiram de forma espontânea em populações humanas – e, surgiram várias vezes, pois a população humana como um todo é extremamente grande. A análise do fenótipo dos indivíduos afetados, em conjunto com estudos de suas células em cultura, tem fornecido muitas informações valiosas sobre importantes funções gênicas em humanos. Apesar de tais mutações serem raras, elas são facilmente descobertas e descritas em virtude de uma característica única do ser humano: os indivíduos mutantes tendem a chamar a atenção sobre si tanto em função de suas peculiaridades quanto pelo fato de buscarem auxílio médico especializado.

Triagens genéticas identificam mutantes deficientes em processos celulares específicos

Uma **triagem genética** envolve tipicamente a análise de milhares de indivíduos que foram submetidos ao processo de mutagênese para identificar aqueles poucos que apresentam o fenótipo alterado de interesse. Por exemplo, para a identificação de genes envolvidos no metabolismo celular, devemos triar células submetidas ao processo de mutagênese, selecionando aquelas que perderam a capacidade de crescer ou proliferar na ausência de um aminoácido específico ou de um nutriente determinado.

No entanto, existe um problema quando queremos estudar genes que sejam necessários para processos celulares essenciais – síntese do RNA ou controle do ciclo celular, por exemplo. Defeitos nesses genes são geralmente letais, o que significa que estratégias especiais são necessárias para a manutenção das

populações de indivíduos portadores das mutações de interesse. Por exemplo, se você não pode cruzar os mutantes, será impossível estudá-los.

Se o organismo de estudo é diploide – um camundongo ou uma planta de ervilhas, por exemplo – e o fenótipo mutante é recessivo, uma solução simples se apresenta. Basta realizar o cruzamento entre indivíduos heterozigotos, portadores de uma cópia normal do gene e de uma cópia defeituosa. Esses indivíduos apresentarão um fenótipo normal, mas quando cruzados, 25% de sua progênie será constituída por homozigotos mutantes, os quais expressarão o fenótipo mutante letal, ao passo que 50% da progênie será constituída por heterozigotos portadores da mutação que, assim como seus parentais, poderão ser utilizados para cruzamentos e manutenção do estoque.

O que acontece se o organismo de estudo é haploide? Uma possibilidade é a utilização de mutantes *sensíveis à temperatura*. Nesses mutantes, o produto proteico do gene é defeituoso apenas em determinadas condições: ele atua normalmente em uma certa faixa de temperatura (a faixa de temperatura *permissiva*), mas pode ser inativado por uma pequena alteração na temperatura que a afaste da faixa permissiva (ver Figura 19-26). Assim, a alteração pode ser ligada e desligada experimentalmente, apenas por meio de modificações na temperatura. Uma célula que contenha uma mutação sensível à temperatura em um gene essencial para a sobrevivência pode ser mantida viva e em crescimento em uma temperatura permissiva; em um dado momento, a temperatura pode ser alterada, e então o fenótipo mutante será expresso (**Figura 19-28**).

Diversos mutantes sensíveis à temperatura foram isolados para a identificação dos genes que codificam as proteínas bacterianas necessárias para a replicação do DNA. Nesse caso, grandes populações de bactérias tratadas com agentes mutagênicos foram triadas com o objetivo de identificar aquelas incapazes de sintetizar DNA quando fossem aquecidas na faixa de 30 a 42 °C. Mutantes sensíveis à temperatura foram também usados para a identificação de muitas das proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular (apresentada no Capítulo 18), ou que estivessem envolvidas no transporte de proteínas na via secretória em leveduras (apresentada no Capítulo 15).

Genes envolvidos em fenótipos complexos, como transtornos de aprendizagem ou de comportamento, podem também ser estudados pela realização de triagens genéticas em organismos-modelo. Como exemplo, pesquisadores foram capazes de isolar um gene que afeta o comportamento social em nematódeos através da busca de animais que se alimentam isoladamente (**Figura 19-29**).

Um teste de complementação revela se duas mutações estão no mesmo gene

Uma triagem genética em larga escala pode resultar na identificação de diversos mutantes diferentes que apresentam o mesmo fenótipo. Esses defeitos podem estar localizados em diferentes genes que atuam sobre o mesmo processo, ou podem representar diferentes mutações sobre o mesmo gene. Como poderemos distinguir entre essas duas possibilidades? Se as mutações são recessivas – por exemplo, se elas representam a perda de função de um determinado gene – um **teste de complementação** pode revelar se as mutações ocorrem sobre um mesmo gene ou sobre genes diferentes.

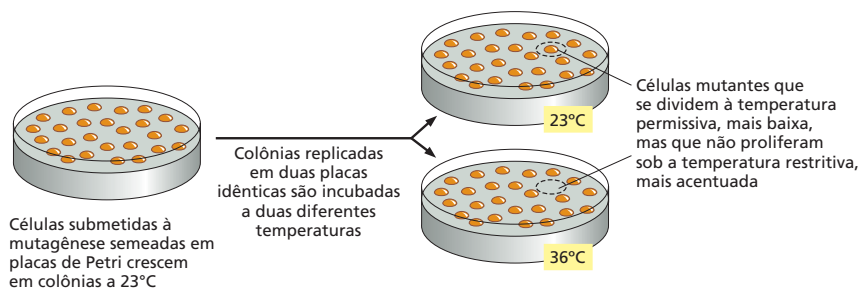
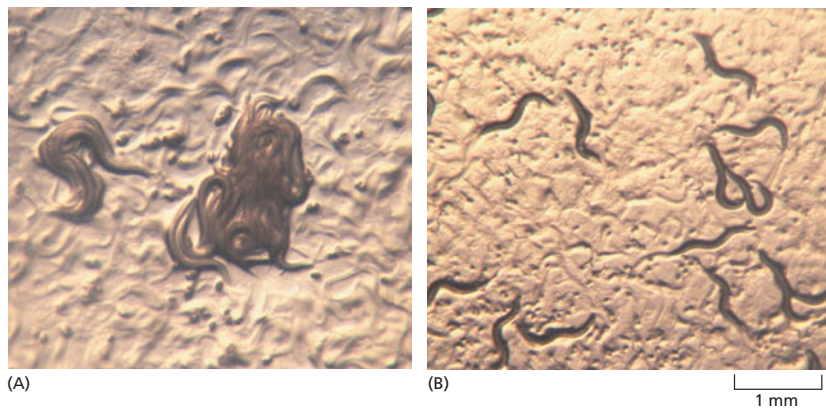
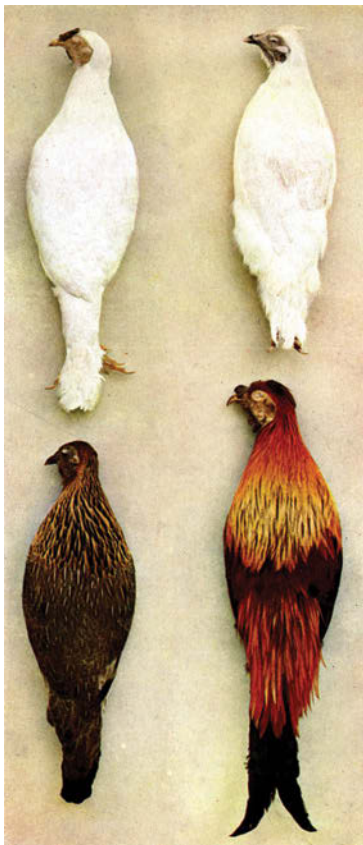



Figura 19-28 Mutantes sensíveis à temperatura são úteis para a identificação de genes e proteínas envolvidos em processos essenciais. No exemplo, células de levedura foram incubadas com um agente químico que provoca mutações em seu DNA. Essas células foram semeadas em placas de cultura e crescidas em temperatura relativamente baixa, o que permitiu que crescessem e formassem colônias. As colônias foram então transferidas para duas placas de Petri idênticas pelo uso da técnica denominada réplica em placas. Uma dessas placas foi incubada à temperatura mais baixa, e a outra foi incubada a uma temperatura mais alta. As células que contêm uma mutação sensível à temperatura sobre um gene essencial para a proliferação serão facilmente identificadas, pois dividirão sob a temperatura baixa – a temperatura *permissiva* – e não conseguirão proliferar na temperatura mais alta – a temperatura *restritiva* ou *não permissiva*.

Figura 19-29 Triagens genéticas podem ser usadas para identificar mutações que afetam o comportamento animal. (A) *C. elegans* de tipo selvagem engajados em processo de alimentação conjunta. Os nematódeos nadam até encontrarem outros animais e então iniciam o processo de alimentação. (B) Nematódeos mutantes se alimentam isoladamente. (Cortesia de Cornelia Bargmann, capa de *Cell* 94, 1998. Com permissão de Elsevier.)

QUESTÃO 19-4

Quando dois indivíduos de diferentes isolados subpopulacionais endocruzados de uma espécie são cruzados, sua progênie geralmente apresenta o chamado "vigor híbrido": ou seja, a prole se apresenta mais robusta, saudável e fértil do que qualquer um dos parentais. Como você explica esse fenômeno?

No tipo mais simples de teste de complementação, um indivíduo homozigoto para uma mutação recessiva – ou seja, um indivíduo que possui duas cópias idênticas do alelo mutante – é cruzado com um indivíduo homozigoto para outra mutação. Se as duas mutações ocorrem sobre o mesmo gene, a prole desse cruzamento apresentará o fenótipo mutante, pois carregará apenas cópias defeituosas do gene em questão (ver Painel 19-1, p. 674). Se, ao contrário, as mutações ocorrem sobre genes diferentes, a prole resultante apresentará o fenótipo de tipo selvagem, normal, pois ela possuirá uma cópia normal (e uma cópia mutante) de cada gene.

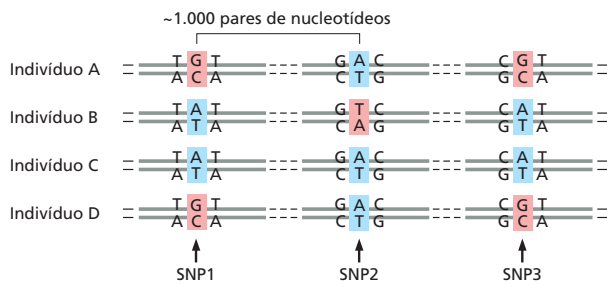
Quando o fenótipo normal é restaurado nesse tipo de teste, diz-se que os conjuntos alélicos herdados dos parentais são *complementares* um em relação ao outro (Figura 19-30). O teste de complementação de mutantes identificados durante triagens genéticas revelou, por exemplo, que são necessários 5 genes para que uma levedura possa digerir o açúcar galactose, 20 genes são necessários para a construção de um flagelo funcional de *E. coli* e que centenas de genes estão envolvidos no desenvolvimento de um nematódeo adulto a partir de um óvulo fertilizado.

Polimorfismos de nucleotídeo único servem como referência para o mapeamento de genes

Com a recente determinação da sequência completa do genoma humano, o estudo de genética humana é hoje possível sob ópticas que seriam absolutamente impossíveis há poucos anos. Utilizando a sequência do genoma humano como ponto de início, podemos começar a identificar diretamente, via sequenciamento de genes, quais diferenças no DNA distinguem um indivíduo de outro.

Com exceção dos gêmeos monozigóticos, não existem dois indivíduos humanos que compartilhem o mesmo genoma. Cada um de nós carrega em seu genoma um conjunto único e característico de variações nas sequências de nucleotídeos. Em regiões específicas de nosso genoma, essas variações podem ser comuns e mesmo relativamente inócuas, de tal forma que é bastante provável que duas pessoas quaisquer, escolhidas ao acaso, sejam distintas para essa posição. Nesses casos, quando duas ou mais sequências variantes coexistem em uma população e são relativamente comuns, elas são chamadas de **polimorfismos**. Alguns desses polimorfismos correspondem a deleções ou inserções de grandes sequências de DNA; no entanto, as variações mais comuns correspondem a substituições de nucleotídeo único.

Figura 19-30 Um teste de complementação revela que dois diferentes genes podem ser responsáveis pelo mesmo fenótipo. Nesse cruzamento, uma galinha da linhagem *Recessive White* (*parte superior, à esquerda*) foi cruzada com um galo da raça *Silky* (*não ilustrado*) que também é branco. A prole resultante (mostrada na parte inferior) apresentou coloração normal, o que significa que as duas linhagens são brancas devido a mutações em genes distintos. Uma fêmea da raça *Silky* está representada na porção *superior direita* da figura. (De W. Bateson, *Mendel's Principles of Heredity*, 1. ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1913. Com permissão de Cambridge University Press.)

Figura 19-31 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são locais no genoma onde dois ou mais nucleotídeos variantes alternativos são comuns na população. A maior parte desse tipo de variação no genoma humano se localiza em regiões cuja alteração não afeta significativamente a função de um gene.

Tipicamente, qualquer par de seres humanos difere em torno de 0,1% de suas sequências nucleotídicas (aproximadamente um nucleotídeo de diferença em cada 1.000 nucleotídeos). Isso resulta em aproximadamente 3 milhões de diferenças de nucleotídeo único entre uma pessoa e outra. Esses **polimorfismos de nucleotídeo único**, ou **SNPs** (Figura 19-31), podem ser usados como marcadores para a construção de mapas genéticos ou para o direcionamento de buscas de mutações que estejam correlacionadas a doenças específicas ou à predisposição a doenças. O painel Como Sabemos, nas páginas 680-681, explica como os SNPs são usados de diferentes formas para atingir esse último objetivo. Mutações que dão origem, de forma regular e reproduzível, a anomalias raras, mas claramente definidas, como é o caso do albinismo e da surdez hereditária, podem geralmente ser identificadas por meio de estudos familiares. Doenças comuns, de origem mais complexa, como é o caso do diabete ou da artrite, necessitam abordagens diferentes para sua compreensão. Para essas condições, não existe um único gene importante, mas diversos genes, associados a fatores ambientais, que afetam o risco de desenvolvimento da doença. No entanto, com o auxílio de análises de SNPs, é cada vez mais provável que identifiquemos esses genes.

Com o intuito de realizar essas análises, os pesquisadores obtêm DNA de um grande número de indivíduos afetados pela doença e comparam essas amostras com as amostras de DNA de um grupo-controle de pessoas que não apresenta a doença em estudo. Suponha, por exemplo, que um determinado alelo de um gene seja responsável por elevar o risco de um indivíduo sofrer um ataque cardíaco. Pessoas que herdaram esse alelo também são mais propensas a ter herdado um conjunto de SNPs que esteja geneticamente ligado a esse alelo. Dessa forma, SNPs que sejam excepcionalmente comuns entre pacientes que sofreram ataque cardíaco podem ser usados como marcadores que indicam a existência de um alelo de risco em um gene próximo (Figura 19-32).

Essa abordagem foi utilizada para a busca de genes que afetam a suscetibilidade a doenças humanas comuns, como diabete, doença arterial coronariana,

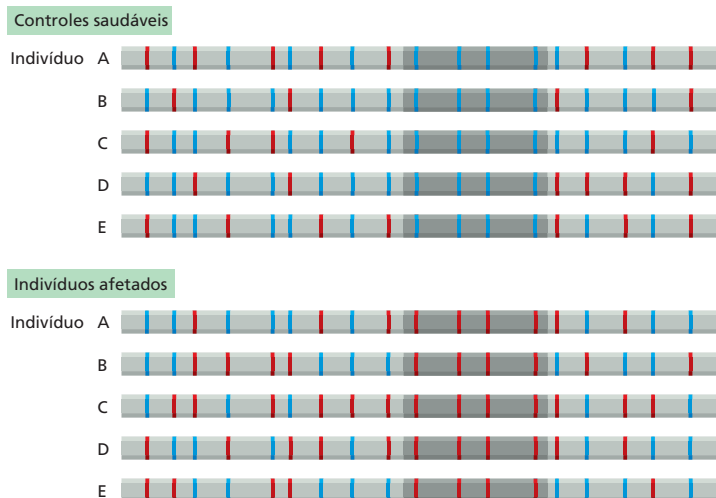



Figura 19-32 Genes que afetam a suscetibilidade a doenças comuns podem ser identificados pela análise de SNPs. No exemplo, o padrão de SNPs foi comparado entre dois grupos de indivíduos, um grupo de controles saudáveis e um grupo de indivíduos afetados por uma determinada doença comum. Um segmento de um cromossomo típico está ilustrado. Para a maioria dos sítios polimórficos dessa região, há uma representação aleatória em relação à presença de uma variante de SNP (*vermelha*) ou outra (*azul*), e essa mesma aleatoriedade parece ocorrer tanto no grupo-controle quanto entre os indivíduos doentes. No entanto, na porção do cromossomo que está sombreada em *cinza-escuro*, há uma tendência, em que a maioria dos indivíduos normais possui a variante *azul* dos SNPs e a maioria dos indivíduos afetados possui as variantes *vermelhas* dos SNPs. Essa situação sugere fortemente que a região contém, ou está muito próxima a, um gene que está geneticamente ligado a essas variantes vermelhas dos SNPs e que predispõem à doença. O uso de controles cuidadosamente selecionados e de um número grande (milhares) de indivíduos permite que essa técnica seja usada para a identificação de genes relacionados a doenças mesmo quando seus alelos comuns (as variantes de SNP) conferem apenas uma pequena elevação no risco de desenvolvimento de uma dada doença.

COMO SABEMOS:
O USO DOS SNPS PARA A COMPREENSÃO DE DOENÇAS EM SERES HUMANOS

A identificação do gene responsável, no caso de doenças que têm base genética, pode ser o primeiro passo rumo a um melhor diagnóstico ou mesmo à cura. Essa não é tarefa simples, mas a possibilidade de acesso aos SNPs pode auxiliar-nos. Em 1999, um grupo internacional de cientistas selecionou e catalogou 300.000 SNPs – os polimorfismos de nucleotídeo único que eram mais comuns entre a população humana (ver Figura 19-31). Atualmente, esse banco de dados cresceu e inclui mais de 10 milhões de SNPs distintos. Esses SNPs não ajudam apenas a estabelecer as diferenças que existem entre um indivíduo e outro. Para os geneticistas, eles também servem como pontos de referência que podem indicar o caminho a ser tomado rumo à identificação dos genes envolvidos em doenças humanas comuns, como o diabete, a obesidade, a asma, a artrite, o desenvolvimento de cálculos biliares ou da síndrome das pernas inquietas (ou síndrome de Ekbom).

Construindo um mapa

Uma das formas pelas quais os SNPs auxiliam na busca de genes envolvidos em doenças é fornecendo marcadores físicos que serão usados na construção de detalhados mapas genéticos de ligação. Um mapa genético de ligação indica as posições relativas de diferentes genes. Esses mapas genéticos de ligação se baseiam na frequência de co-herança de dois alelos – algo que pode ser determinado pela observação da frequência de ocorrência conjunta em um indivíduo das características fenotípicas associadas a esses dois alelos. Genes que se encontram próximos um do outro, sobre o mesmo cromossomo, serão herdados em conjunto com muito mais frequência do que genes que estão distantes. A distância relativa entre dois genes pode ser calculada pela determinação da frequência de separação dos dois genes por recombinação (ver Painel 19-1, p. 674).

Esse mesmo tipo de análise pode ser usado para determinar a ligação entre um SNP e um gene. É necessário apenas observar a herança simultânea de uma variante do SNP (detectada por análise da sequência de DNA) e de um alelo do gene (determinado pela característica fenotípica à qual ele dá origem). A identificação de ligação indica que o gene deve encontrar-se próximo ao SNP (**Figura 19-33**). Visto que sabemos a posição exata de cada um dos SNPs analisados, a ligação pode nos indicar a região física onde está o gene. Uma análise mais detalhada dessa região – para a identificação de deleções, inserções ou outros sinais de anomalias na sequência do DNA de indivíduos afetados – poderá nos levar à identificação exata do gene responsável.

Figura 19-33 A análise de SNPs pode propiciar a identificação da posição de uma mutação que causa uma doença genética. Nesse procedimento, estudou-se a herança conjunta de um fenótipo humano específico (no caso, uma doença genética) e um grupo determinado de variantes de SNP. A figura ilustra a lógica utilizada em um caso comum de uma família em que ambos os parentais são portadores de uma mutação recessiva. Se indivíduos que apresentam a doença, e apenas esses indivíduos, são praticamente sempre homozigotos para uma determinada variante de SNP, então o SNP e a mutação recessiva causadora da doença provavelmente estão próximos, sobre um mesmo cromossomo, como ilustrado no exemplo. Para provar que uma ligação aparente é estatisticamente significativa, um grupo relativamente grande de indivíduos dessas famílias deverá ser examinado. Pela análise de mais indivíduos e pelo uso de mais SNPs, será possível localizar a mutação com maior exatidão.

Esse tipo de análise de ligação é geralmente realizado em famílias que apresentam uma grande tendência ao desenvolvimento de uma determinada doença – quanto maior a família, melhor. O método usado funcionará melhor se existir uma correlação simples de causa-efeito, por exemplo, se uma determinada mutação definir diretamente e de forma determinante se um dado membro da família apresentará ou não a doença. No entanto, na maioria das doenças comuns, isso não ocorre: diversos fatores interferem no risco de desenvolvimento da doença – alguns são fatores genéticos, outros ambientais, e alguns, apenas uma questão de acaso. Nessas situações, a utilização de uma abordagem distinta faz-se necessária.

Estabelecendo associações

Estudos de associação genética permitem a descoberta de variantes genéticas comuns que afetam o risco de uma doença comum, mesmo que cada variante interfira apenas levemente na suscetibilidade. Visto que mutações que eliminam a atividade de um gene essencial possuem provavelmente um efeito devastador na capacidade de adaptação de um indivíduo mutante, elas tendem a ser eliminadas da população pela seleção natural e apenas raramente são observadas. Por outro lado, variações genéticas que afetam a função de um dado gene apenas superficialmente são muito mais comuns. Estudos de associação genética podem ser usados para caçar essas alterações pequenas, mas frequentes, dando indicações sobre os genes que desempenham papéis importantes na biologia de doenças comuns.

Nos estudos de associação genética, são comparadas diretamente as sequências de DNA de duas populações: indivíduos que apresentam uma determinada doença *versus* indivíduos que não a apresentam. Os estudos de associação são então focados em marcadores genéticos, como as variantes de SNP, que estão presentes nas pessoas que apresentam a doença em uma frequência mais elevada do que aquela esperada ao acaso. Essas variantes de SNP podem *per se* representar a causa da maior frequência da doença nesses indivíduos ou podem estar ligadas a outros polimorfismos ou mutações que levam a esse efeito.

Vamos analisar, por exemplo, o caso da degeneração macular relacionada à idade (AMD), uma doença degenerativa que é a principal causa de cegueira em idosos. Com o intuito de identificar variações genéticas associadas à AMD, pesquisadores analisaram um painel de aproximadamente 100.000 SNPs distribuídos por todo o genoma. Eles determinaram a sequência de cada um desses SNPs em 96 indivíduos com AMD e em 50 indivíduos-controle. Entre os 100.000 SNPs testados, eles identificaram uma variante específica que era mais frequente em indivíduos que desenvolviam a doença (**Figura 19-34**).

O SNP estava localizado em um gene denominado *Cfh* (*fator H do complemento*). No entanto, o SNP estava localizado em um íntron e não parecia ter qualquer efeito sobre o produto proteico. Assim, *per se*, esse SNP não parecia ser responsável pela maior suscetibilidade à doença, mas fez com que os pesquisadores dirigissem uma maior atenção para o gene *Cfh*. Eles então sequenciaram de novo a região em busca de polimorfismos adicionais que poderiam ter sido herdados mais frequentemente por indivíduos com AMD, em conjunto com o SNP que já havia sido identificado. Três variantes que resultavam em uma troca de aminoácidos na proteína Cfh foram identificadas. Um desses alelos, que levava à substituição de uma histidina por uma tirosina em uma região específica da proteína, estava fortemente associado à doença (e em geral sempre estava junto à variante de SNP que originalmente havia colocado o gene *Cfh* no caminho dos pesquisadores). Indivíduos que possuíam duas cópias do alelo de risco apresentavam uma chance sete vezes maior de desenvolver AMD do que indivíduos que possuíam um alelo diferente nessa posição.

Figura 19-34 Estudos de associação genética identificam variações no DNA que são significativamente mais frequentes em pessoas que possuem uma determinada doença. Nesse estudo, os cientistas examinaram mais de 100.000 diferentes SNPs em cada um dos 146 indivíduos. O eixo do x, no gráfico, mostra a posição relativa de cada SNP no genoma, começando à esquerda com os SNPs do cromossomo 1. O eixo do y mostra um índice de correlação de cada SNP analisado com a AMD. A região *azul* indica um ponto de corte para uma significância correspondente a 5%, ou seja, a probabilidade de que os achados de correlação encontrada entre o conjunto de 100.000 SNPs testados corresponda a uma correlação ao acaso. O SNP marcado em *vermelho* é aquele que direcionou as pesquisas rumo ao gene *Cfh*. A associação de outro SNP prevalente com a doença desapareceu quando experimentos adicionais de sequenciamento da região foram realizados, revelando prováveis falhas durante a genotipagem original. (Adaptada de R.J. Klein *et al.*, *Science* 308:385-389,2005. Com permissão de AAAS.)

Vários outros grupos de pesquisadores, usando abordagens similares de associação genética, também indicaram variantes de *Cfh* como responsáveis por uma maior probabilidade de desenvolvimento de AMD, o que nos dá quase a certeza de que esse gene esteja envolvido na biologia dessa doença. O Cfh é parte integrante do sistema do complemento, que auxilia a mediar a imunidade e a inflamação. A proteína normal serve como freio do sistema do complemento, evitando que esse se torne hiperativo. Interessantemente, todos os fatores de risco ambiental associados a essa doença – fumo, obesidade e idade – afetam a atividade do sistema do complemento. Assim, seja qual for o mecanismo específico pelo qual o gene *Cfh* influencia o risco de desenvolvimento da AMD, a descoberta de que o sistema do complemento é essencial pode levar a novos testes para diagnóstico precoce e abre novas vias potenciais para o tratamento dessa doença.

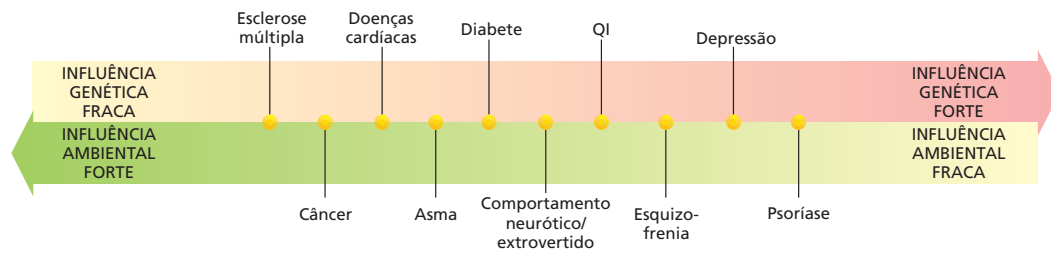



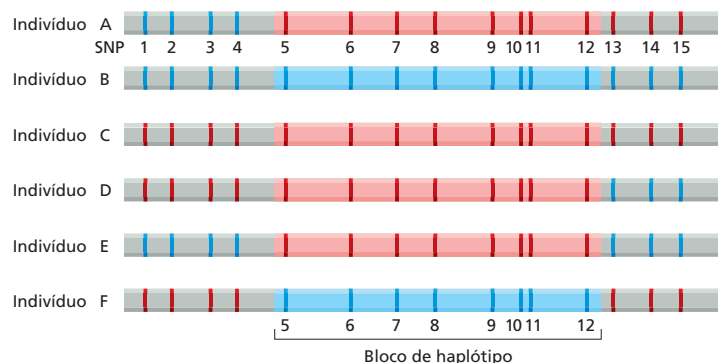
Figura 19-35 Algumas características humanas são fortemente influenciadas pelo ambiente, e outras são menos influenciadas. Estudos com gêmeos monozigóticos e dizigóticos têm sugerido as proporções relativas de contribuição genética e ambiental para diferentes características humanas.

artrite reumatoide, transtorno bipolar (doença maníaco-depressiva) e diversas outras. Em todas essas condições, tanto fatores ambientais como fatores genéticos desempenham um importante papel (Figura 19-35). Além disso, na maioria delas, os próprios fatores genéticos são complexos: não existe um gene único, mas vários que contribuem para a incidência da doença. Pela identificação dos genes envolvidos nessas doenças – e dos polimorfismos associados a elas –, torna-se possível não apenas diagnosticar e auxiliar as pessoas que apresentam um risco aumentado, mas também obter mais informações a respeito dos mecanismos moleculares dessas doenças.

Grupos de ligação e SNPs definem os blocos de haplótipos

Naturalmente, quanto mais SNPs forem analisados para a identificação de um gene, maior será o custo e o trabalho de tal abordagem. Felizmente, com o objetivo de mapeamento genético, não é necessário examinar todos os 3 milhões de SNPs do genoma humano. Isso acontece porque os SNPs não podem ser considerados como unidades independentes e não correlacionadas: eles estão efetivamente ligados a seus vizinhos mais próximos em blocos – nos chamados **blocos de haplótipos** –, que tendem a ser herdados em conjunto, como uma unidade. Assim, indivíduos que possuem uma variante específica em um sítio polimórfico determinado possuem uma alta probabilidade de também possuir variantes correlacionadas em todos os sítios polimórficos vizinhos, dentro do bloco de haplótipo (Figura 19-36). Dessa forma, é suficiente examinar um ou dois SNPs representativos para cada bloco de haplótipo.

Para compreender por que os blocos de haplótipo existem, devemos considerar nossa história evolutiva. Acredita-se que os humanos atuais se expandiram a partir de uma população relativamente pequena que existiu na África há aproximadamente 60.000 anos. Entre o pequeno grupo de ancestrais dos quais todos descendemos, alguns indivíduos seriam portadores de um conjunto de variantes genéticas, e outros, de conjuntos diferentes. Os cromossomos dos seres humanos atuais representam uma combinação reorganizada e embaralhada de fragmentos de cromossomos de diferentes membros desse pequeno grupo de indivíduos ancestrais. Visto que apenas cerca de duas mil gerações nos separam da população ancestral, grandes segmentos dos cromossomos humanos ancestrais devem ter passado de geração em geração sem que eventos de recombinação os tenham separado durante a meiose. (Recorde que apenas alguns poucos

Figura 19-36 Os SNPs são geralmente herdados em blocos. No exemplo, são salientados 15 nucleotídeos para os quais existem polimorfismos. Por exemplo, no sítio indicado como SNP1, uma parcela da população apresenta A (*azul*), e outra parcela apresenta G (*vermelho*). Diferentes pessoas herdam diferentes conjuntos de variantes, mas os SNPs de 5 a 12 são geralmente herdados em bloco. Ou seja, se um cromossomo contém a forma variante *vermelha* de qualquer um dos SNPs deste bloco, ele também conterá a forma variante *vermelha* de todos os demais e, em contrapartida, se ele contém a forma variante *azul* de um, conterá a variante *azul* de todos os outros.

crossing-overs ocorrem em cada cromossomo humano a cada evento da meiose.) Como resultado, certos conjuntos de alelos – e marcadores de DNA como os SNPs – são herdados em grupos de ligação. Esses segmentos cromossômicos ancestrais – conjuntos de alelos e marcadores que têm sido herdados em bloco e que apresentam pouco rearranjo genético ao longo de gerações – são os blocos de haplótipos. Assim como genes e marcadores genéticos – que existem em diferentes formas alélicas –, também os blocos de haplótipos têm um número restrito de variantes comuns na população humana, cada variante representativa de uma combinação de alelos transferida para a progênie, há muito tempo, a partir de um determinado ancestral.

Blocos de haplótipos dão indicações sobre nossa história evolutiva

Um exame detalhado dos blocos de haplótipo pode fornecer informações incríveis sobre a história das populações humanas. Novos alelos são, de forma contínua, gerados por mutação. Muitas dessas variantes serão seletivamente neutras – ou seja, elas não afetarão o sucesso reprodutivo do indivíduo – e assim apresentarão uma chance de tornarem-se comuns na população. Quanto mais tempo tiver transcorrido desde a origem de um dado alelo, menor será o bloco de haplótipo em seu entorno, pois, ao longo de muitas gerações, eventos de recombinação terão muitas chances de separar o novo alelo dos SNPs adjacentes. Pela comparação do tamanho dos blocos de haplótipo de diferentes populações humanas é possível estimar quantas gerações transcorreram desde a origem de uma mutação específica. Dessa forma, a combinação de comparações genéticas e arqueologia permite traçar a nossa história até um pequeno grupo de ancestrais africanos, bem como nos permite fazer deduções a respeito das rotas mais prováveis utilizadas por nossos ancestrais quando eles migraram a partir desse continente (**Figura 19-37**).

Alelos seletivamente neutros demoram um tempo bastante longo para estabelecerem-se em uma população, mas um alelo que seja fortemente favorecido pela seleção natural rapidamente se espalhará na população e alcançará uma frequência elevada. Por exemplo, uma mutação ou variação que faça com que um organismo seja mais resistente a uma infecção será favorecido pela seleção, pois organismos com essa variante terão maior probabilidade de sobreviver e de passar essa mutação para a sua progênie. Mais uma vez, a análise de haplótipos pode ser usada para estimar quando um evento genético histórico dessa natureza ocorreu. Se uma mutação favorável se disseminou na população relativamente há pouco tempo, poucas oportunidades terão existido para que eventos de recombinação tenham fragmentado a região em torno da mutação, de tal forma que o bloco de haplótipo em sua vizinhança será grande. Essa situação é vista em dois genes diferentes que conferem resistência à malária. Os alelos que conferem resistência são amplamente distribuídos em populações Africanas, onde a malária é prevalente. Além disso, eles estão inseridos em blocos de haplótipos excepcionalmente grandes, o que sugere que essas variantes de proteção se disseminaram recentemente no *pool* genético africano – uma das variantes datando provavelmente de cerca de 2.500 anos, e a outra de aproximadamente 6.500 anos. Dessa forma, a análise dos genomas atuais pode revelar a história de

QUESTÃO 19-5

Em uma recente análise automatizada, milhares de SNPs localizados ao longo do genoma foram analisados em um *pool* de amostras de DNA humano, as quais haviam sido separadas de acordo com a idade. Para a maioria desses sítios, não houve alteração na frequência relativa das diferentes variantes, em relação ao aumento de idade. No entanto, uma variante existente em uma dada posição apresentou uma redução progressiva de frequência em indivíduos com idade superior a 50 anos. Qual das possíveis explicações a seguir lhe parece mais plausível?

A. O nucleotídeo identificado pelo SNP nessa posição é instável e muta ao longo do envelhecimento.
B. As pessoas nascidas há mais de 50 anos pertencem a uma população com tendência à perda dessa variante do SNP.
C. A variante desse SNP altera um importante produto gênico de tal forma que ocorre redução da expectativa de vida em humanos, ou ela se encontra ligada a um alelo adjacente que possui esse mesmo efeito.

Figura 19-37 As populações humanas que atualmente se encontram dispersas pelo mundo se originaram na África há cerca de 60.000-80.000 anos. O mapa ilustra as rotas das primeiras migrações efetuadas com sucesso que se acredita que tenham sido utilizadas. Linhas pontilhadas indicam duas rotas alternativas que podem ter sido usadas para a emigração da África. Estudos do tamanho de blocos de haplótipos indicam que os europeus atuais são descendentes de um pequeno grupo de ancestrais, representando um efeito gargalo-de-garrafa que ocorreu há aproximadamente 30.000-50.000 anos. Blocos de haplótipos na população da Nigéria são significativamente menores, indicando que a população Nigeriana se estabeleceu há mais tempo. Esses dados estão em concordância com dados arqueológicos que sugerem que os ancestrais dos atuais nativos australianos (setas *vermelhas* sólidas) – e as populações atuais da Europa e do Oriente Médio (rotas migratórias não ilustradas) – estabeleceram-se há aproximadamente 45.000 anos. (Modificado de P. Forster e S. Matsumura, *Science* 308:965-966,2005. Com permissão de AAAS.)

exposições passadas dos seres humanos a infecções específicas e do desenvolvimento de nossa resistência a essas infecções.

Ao revelar os caminhos percorridos na evolução humana, o mapa de haplótipos e SNPs humanos fornece uma nova janela sobre nosso passado; ao auxiliar-nos na descoberta de genes que nos tornam suscetíveis ou resistentes a doenças, esse mesmo mapa pode nos levar a novas formas de lidar com problemas médicos da atualidade.

CONCEITOS ESSENCIAIS

- A reprodução sexuada envolve a alternação cíclica entre os estágios diploide e haploide: as células diploides se dividem por meiose para formar os gametas haploides, e os gametas haploides provenientes de dois indivíduos se fusionam na fecundação para formar uma nova célula diploide.
- Durante a meiose, os cromossomos de origem paterna e materna, em uma célula diploide, distribuem-se entre os gametas de tal forma que cada gameta recebe uma cópia de cada cromossomo. Visto que a distribuição dos dois membros de cada par de cromossomos ocorre de forma aleatória, muitos gametas geneticamente distintos podem ser formados por um único indivíduo.
- O *crossing-over* garante a segregação adequada dos cromossomos homólogos e amplifica a redistribuição genética que ocorre durante a meiose, por meio da troca de genes entre os homólogos de origem materna e paterna.
- Apesar de a maioria das características mecânicas da meiose serem similares às presentes na mitose, o comportamento dos cromossomos é diferente: a meiose gera quatro células haploides geneticamente distintas após duas divisões celulares consecutivas, ao passo que a mitose dá origem a duas células diploides geneticamente idênticas por meio de uma única divisão celular.
- Mendel desvendou as leis da hereditariedade por meio do estudo da herança de uma pequena quantidade de características distintas em plantas de ervilha.
- A lei da segregação de Mendel postula que os alelos de origem materna e paterna de cada característica são separados um do outro durante a formação dos gametas e, a seguir, são reunidos aleatoriamente durante a fecundação.
- A lei de Mendel da segregação independente postula que, durante a formação dos gametas, diferentes alelos segregarão de forma independente uns dos outros.
- O comportamento dos cromossomos durante a meiose corrobora as leis de Mendel.
- Se dois genes estão muito próximos um do outro sobre um cromossomo, eles tendem a ser herdados como uma única unidade. A frequência de recombinação entre os genes pode ser usada como ferramenta para a construção de um mapa gênico que mostra a sua ordem sobre cada cromossomo.
- Alelos mutantes podem ser dominantes ou recessivos. Se o organismo heterozigoto apresenta um fenótipo mutante, o alelo mutante é dominante; se o organismo apresenta o fenótipo normal, o alelo mutante é recessivo.
- Testes de complementação revelam se duas mutações que produzem o mesmo fenótipo se localizam sobre o mesmo gene ou em genes diferentes.
- Organismos mutantes podem ser gerados pelo tratamento de animais com agentes químicos que provocam danos ao DNA. Esses mutantes po-

dem, a seguir, ser triados para a identificação de fenótipos de interesse e, como objetivo final, para o isolamento dos genes responsáveis.

- **Excetuando-se os gêmeos monozigóticos, não existem dois seres humanos que compartilhem o mesmo genoma. Cada um de nós carrega um conjunto único e característico de polimorfismos – variações na sequência de nucleotídeos – que moldam nossos fenótipos individuais.**
- **Polimorfismos são sítios de alta variabilidade na sequência genômica, de tal forma que dois indivíduos aleatoriamente selecionados de uma população apresentam uma alta probabilidade de serem diferentes em relação a essas regiões.**
- **Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são polimorfismos onde a variabilidade se concentra em um único nucleotídeo e que apresentam duas ou mais variantes relativamente comuns na população. SNPs nos fornecem marcadores úteis para o mapeamento genético.**
- **SNPs humanos tendem a ser herdados em grandes blocos de haplótipos – segmentos do genoma que foram herdados intactos a partir de ancestrais distantes e que na maioria dos indivíduos não foram ainda separados pela recombinação meiótica. O tamanho dos blocos de haplótipos nos permite inferir nossa história evolutiva.**

TERMOS-CHAVE

alelo
reprodução assexuada
bivalente
quiasma
teste de complementação
característica complexa
crossing-over
diploide
fecundação
mutação de ganho de função
gameta
mapa genético
triagem genética
genética
genótipo
célula germinativa
linhagem germinativa
haploide
bloco de haplótipo
heterozigoto
homólogo
cromossomo homólogo
homozigoto
lei do arranjo independente
lei da segregação
mutação de perda de função
meiose
pareamento
heredograma
fenótipo
polimorfismo
recombinação
cromossomo sexual
reprodução sexuada
cromátide-irmã
SNP (polimorfismo de nucleotídeo único)
célula somática
zigoto

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 19-6

É fácil observar como mutações deletérias em bactérias, que apresentam uma única cópia de cada gene, são eliminadas por seleção natural: a bactéria afetada morre, e a mutação é, dessa forma, eliminada da população. Eucariotos, no entanto, possuem duas cópias da maioria de seus genes – ou seja, eles são diploides. Frequentemente, um indivíduo com duas cópias normais de um gene (homozigoto normal) não é passível de ser distinguido fenotipicamente de um indivíduo que possui uma cópia normal e uma cópia defeituosa do gene (heterozigoto). Nesses casos, a seleção natural pode apenas atuar contra um indivíduo que possua duas cópias do gene defeituoso (homozigoto defeituoso). Considere uma situação em que uma forma defeituosa de um gene seja letal em homozigose, mas não apresente efeito em heterozigose. Tal mutação pode ser eliminada da população por seleção natural? Justifique sua resposta.

QUESTÃO 19-7

Quais das seguintes afirmações estão corretas? Justifique suas respostas.

A. Os óvulos e os espermatozoides dos animais contêm genomas haploides.

B. Durante a meiose, os cromossomos se posicionam de tal forma que cada célula germinativa receberá uma única cópia de cada um dos diferentes cromossomos.

C. Mutações que ocorrem durante a meiose não serão transmitidas para a próxima geração.

QUESTÃO 19-8

O que pode provocar uma não disjunção cromossômica que resulte em duas cópias do mesmo cromossomo na mesma célula-filha? Quais seriam as consequências se esse evento ocorresse (a) na mitose e (b) na meiose?

QUESTÃO 19-9

Por que as cromátides-irmãs devem permanecer pareadas na divisão I da meiose? Sua resposta pode ser usada como uma boa estratégia visando a uma maior eficiência durante a lavagem de pares de meias?

QUESTÃO 19-10

Diferencie os seguintes termos genéticos:

A. Gene e alelo.

B. Homozigoto e heterozigoto.

C. Genótipo e fenótipo.

D. Dominante e recessivo.

QUESTÃO 19-11

Você recebeu três ervilhas rugosas, as quais serão denominadas A, B e C, e plantou cada uma dessas sementes obtendo uma planta madura. Após a autopolinização dessas três plantas, houve produção apenas de ervilhas rugosas.

A. Considerando que você sabe que o fenótipo de ervilha rugosa é recessivo, resultando de uma mutação de perda de função, o que poderá dizer a respeito do genótipo de cada planta?

B. Você poderia concluir com segurança que as três diferentes plantas possuem uma mutação sobre o mesmo gene?

C. Caso sua resposta em B seja negativa, como você poderia eliminar a possibilidade de que cada planta carrega uma mutação em um gene diferente, apesar de todas as mutações conferirem o mesmo fenótipo, ou seja, ervilhas rugosas?

QUESTÃO 19-12

O avô de Susan era surdo e transmitiu essa forma hereditária de surdez para diferentes membros da família, como ilustrado na **Figura Q19-12**.

A. Essa mutação é mais provavelmente de caráter dominante ou recessivo?

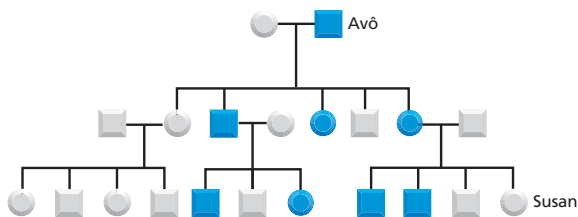



Figura Q19-12

B. Essa mutação ocorreu sobre um cromossomo autossômico ou sobre um cromossomo sexual? Por quê?

C. Uma análise completa de SNPs foi realizada em todos os onze netos (quatro afetados e sete livres da doença). Comparando todos os resultados desses SNPs, você esperaria encontrar um bloco de haplótipos de que tamanho? Como você detectaria esse bloco de haplótipos?

QUESTÃO 19-13

Considerando-se que a mutação causadora de surdez na família ilustrada na Figura 19-22 é bastante rara, qual é o genótipo mais provável de cada uma das quatro crianças na geração II?

QUESTÃO 19-14

No heredograma ilustrado na **Figura Q19-14**, o primeiro indivíduo nascido em cada uma das três gerações é a única pessoa afetada por uma doença dominante geneticamente herdada, D. Seu amigo conclui que a primeira criança nascida tem uma maior probabilidade de herdar o alelo mutante *D* do que as crianças posteriormente geradas.

A. De acordo com as leis de Mendel, essa conclusão é plausível?

B. Qual é a probabilidade de ocorrência, ao acaso, do evento descrito?

C. Que tipo de dados adicionais você necessitaria para testar a hipótese enunciada por seu amigo?

D. Existe alguma forma de a hipótese formulada por seu amigo estar correta? Explique.

QUESTÃO 19-15

Suponha que uma pessoa em cada 100 seja portadora de uma mutação recessiva de tal forma deletéria que bebês homozigotos para a mutação morram logo após seu nascimento. Em uma população onde ocorram 1.000.000 de nascimentos por ano, quantos bebês nascerão com essa condição homozigota fatal nesse mesmo período?

QUESTÃO 19-16

Determinadas mutações são chamadas de *mutações dominante-negativas*. O que você pode inferir sobre a ação dessas mutações? Explique a diferença entre uma mutação dominante-negativa e uma mutação de ganho de função.

QUESTÃO 19-17

Discuta a seguinte afirmação: “Provavelmente não teríamos qualquer informação sobre a importância da insulina como hormô-

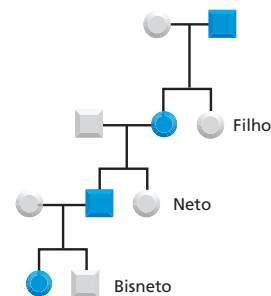



Figura Q19-14

nio regulador se sua ausência não estivesse associada à terrível doença conhecida como diabete em humanos. São as dramáticas consequências de sua ausência que impulsionaram os primeiros esforços no sentido da identificação da insulina e do estudo de sua função normal na fisiologia".

QUESTÃO 19-18

Os estudos genéticos iniciais em *Drosophila* estabeleceram os alicerces de nosso conhecimento atual dos genes. Os drosofilistas foram capazes de gerar moscas mutantes com uma enorme diversidade de alterações fenotípicas facilmente identificáveis. Alterações da cor normal vermelho-tijolo dos olhos das moscas são um marco nessa história, pois o primeiro mutante encontrado por Thomas Hunt Morgan foi uma mosca com olhos brancos (**Figura Q19-18**). Desde esse período, um grande número de moscas mutantes com olhos de cores intermediárias foram isoladas e receberam nomes que desafiam o próprio sentido da cor: *garnet*, rubi, *vermilion*, cereja, coral, *apricot*, *buff* e *carnation*. As mutações responsáveis por esses fenótipos de coloração dos olhos são todas recessivas. Para determinar se as mutações afetam o mesmo gene ou genes diferentes, moscas homozigotas para cada mutação foram cruzadas umas às outras, em pares, e a coloração dos olhos de sua progênie foi analisada. Na **Tabela Q19-18**, um sinal de + ou de – indica o fenótipo das moscas produzidas como progênie do acasalamento entre a mosca listada na parte superior da tabela e a mosca listada na coluna da esquerda. A coloração tipo selvagem vermelho-tijolo está anotada como (+), e as demais colorações como (–).

A. Como pode ser explicado que moscas com dois diferentes tipos de coloração dos olhos – rubi e brancos, por exemplo – podem dar origem a uma progênie que possui em sua totalidade olhos vermelho-tijolo?
B. Que mutações correspondem a alelos do mesmo gene e quais afetam genes diferentes?
C. Como diferentes alelos, sobre o mesmo gene, podem originar diferentes colorações nos olhos?

QUESTÃO 19-19

O que são polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e como eles podem ser usados para posicionar um gene mutante por meio de análises de ligação?

QUESTÃO 19-20

Os genomas completos de Tim e John foram sequenciados. Esse procedimento resultou em uma lista de 3 milhões de sítios onde suas sequências de DNA diferiam por um único nucleotídeo. Por que muitos desses sítios variáveis não serão marcadores de DNA úteis para experimentos de mapeamento genético? Que experimentos você poderia realizar para distinguir entre sítios variáveis úteis e não úteis?

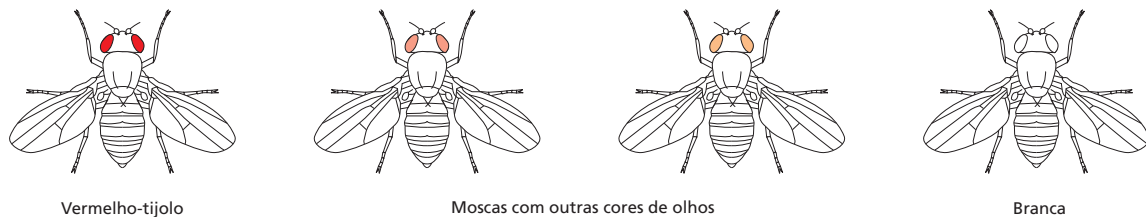
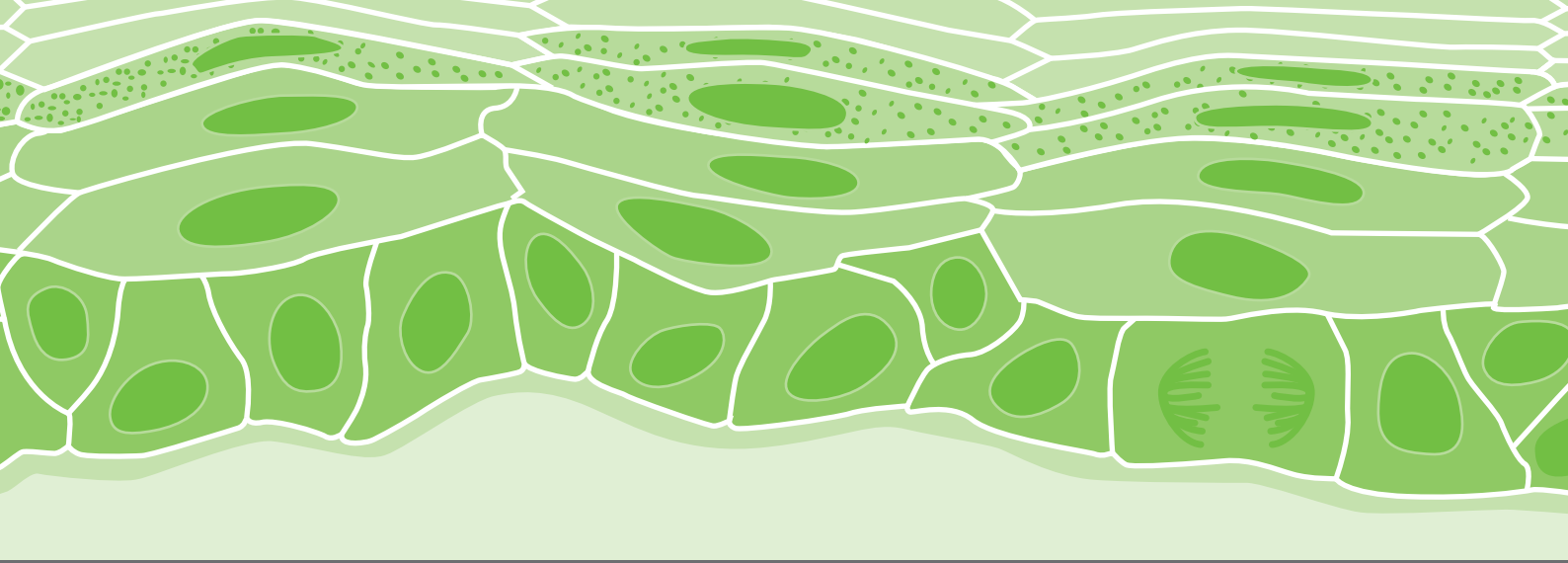



Figura Q19-18

TABELA Q19-18 Análise de complementação de mutações de coloração dos olhos em *Drosophila*

Mutação	Branca	*Garnet*	Rubi	*Vermilion*	Cereja	Coral	*Apricot*	*Buff*	*Carnation*
Branca	–	+	+	+	–	–	–	–	+
Garnet		–	+	+	+	+	+	+	+
Rubi			–	+	+	+	+	+	+
Vermilion				–	+	+	+	+	+
Cereja					–	–	–	–	+
Coral						–	–	–	+
Apricot							–	–	+
Buff								–	+
Carnation									–

+ indica que a progênie de um cruzamento entre indivíduos apresentando as colorações de olhos indicadas são fenotipicamente normais; – indica que a coloração dos olhos da progênie é anormal.

CAPÍTULO 20

Comunidades Celulares: Tecidos, Células-tronco e Câncer

As células são os alicerces dos organismos multicelulares. Essa parece uma afirmativa simples, mas levanta questões profundas. As células não são como os tijolos, elas são pequenas e sensíveis. Como elas podem ser usadas para constituir uma girafa ou uma árvore gigante? Cada célula é circundada por uma fina membrana com menos de centenas de milhares de milímetros de espessura e depende da integridade dessa membrana para sobreviver. Como, então, as células podem ser mantidas juntas firmemente, com suas membranas intactas, para formar o músculo que erguerá o peso de um elefante? O maior mistério de todos – se as células são os alicerces – é onde está o construtor e os planos do arquiteto? Como são produzidos todos os diferentes tipos celulares em uma planta ou animal, com cada uma em seu local adequado em um padrão muito elaborado (**Figura 20-1**)?

A maioria das células em um organismo multicelular estão organizadas em um conjunto cooperativo denominado **tecidos**, como o nervoso, o muscular, o epitelial e o conectivo encontrado nos vertebrados (**Figura 20-2**), Neste capítulo, iniciaremos discutindo a arquitetura dos tecidos do ponto de vista mecânico. Veremos que os tecidos são compostos não somente por células, com sua estrutura interna de filamentos do citoesqueleto (discutido no Capítulo 17), mas também de **matriz extracelular**, que é secretada pelas próprias células ao seu redor, e essa matriz fornece o apoio aos tecidos, como o osso ou a madeira. As células podem ser mantidas unidas através da matriz extracelular ou diretamente ligadas uma à outra. Discutiremos as *junções celulares*, que ligam uma célula à outra nos tecidos móveis e flexíveis dos animais, transmitindo as forças do citoesqueleto de uma célula para a outra, ou do citoesqueleto de uma célula para a matriz extracelular.

Há muito mais na organização dos tecidos do que somente a mecânica. Assim como as construções necessitam de encanamento, linhas telefônicas e

Figura 20-1 Os organismos multicelulares são constituídos de grupos organizados de células. Secção transversal corada da folha de um pinheiro (espinho) mostrando o padrão de organização precisa de diferentes tipos celulares.

outros complementos, os tecidos animais requerem vasos sanguíneos, nervos e outros componentes formados por uma variedade de tipos celulares especializados. Todos os componentes dos tecidos têm de ser coordenados corretamente, e muitos deles requerem renovação e manutenção contínuas. As células morrem e devem ser substituídas com novas células do tipo correto, no lugar e em número adequados. Consideraremos como esses processos são organizados e discutiremos o papel crucial das **células-tronco** na renovação e no reparo dos tecidos.

Os distúrbios na renovação dos tecidos são uma das principais preocupações médicas, e aquelas devidas a um comportamento errôneo de células mutantes são as responsáveis pelo desenvolvimento do *câncer.* Essa doença será o tópico da ultima seção deste capítulo. O estudo do câncer requer uma síntese do conhecimento a respeito das células e dos tecidos em vários níveis, da biologia molecular do reparo do DNA aos princípios da seleção natural e da organização social das células em tecidos. Muitos avanços fundamentais na biologia celular têm sido direcionados pelas pesquisas com câncer, e veremos que a ciência básica, por sua vez, resultou no profundo entendimento da doença e em um novo otimismo acerca de seu tratamento.

MATRIZ EXTRACELULAR E TECIDO CONECTIVO

As plantas e os animais evoluíram sua organização multicelular de forma independente, e seus tecidos são construídos em diferentes princípios. Os animais matam outros seres vivos para se alimentarem, e, para isso, eles devem ser fortes e ágeis. Eles devem possuir tecidos capazes de movimentos rápidos, e as células que formam esses tecidos devem ser capazes de gerar e transmitir força e mudar de forma rapidamente. As plantas, por outro lado, são sedentárias, e seus tecidos são mais ou menos rígidos, e suas células são fracas e frágeis se isoladas do seu tecido de sustentação.

A força do tecido vegetal vem da **parede celular**, formada como caixas que cercam, protegem e restringem a forma de cada uma de suas células (**Figura 20-3**). A parede celular é um tipo de matriz extracelular que a célula vegetal secreta ao redor de si mesma. A célula controla a composição de seu material. Ela pode ser grossa e dura, como na madeira, ou fina e flexível, como na folha. No entanto, o princípio da construção do tecido é o mesmo nos dois casos. Muitas caixas finas são unidas com uma delicada célula em seu interior. Além disso, como vimos no Capítulo 1, foi essa massa compacta de câmaras microscópicas que Robert Hooke observou na fatia de cortiça há três séculos, que deu origem ao termo "célula".

Os tecidos animais são mais diversos. Como os tecidos vegetais, eles consistem em matriz extracelular, bem como de células, mas esses componen-

Figura 20-2 As células são organizadas em tecidos. Desenho simplificado de uma secção transversal de parte da parede do intestino de mamíferos. Este órgão longo em forma de tubo é constituído por tecidos epiteliais (em *vermelho*), tecido conectivo (em *verde*) e tecido muscular (em *amarelo*). Cada tecido é uma reunião organizada de células que são unidas por adesões célula-célula, matriz extracelular ou ambos.

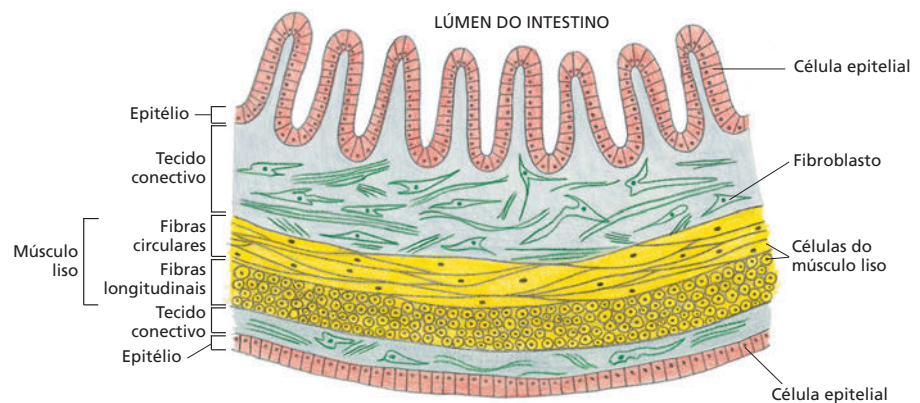
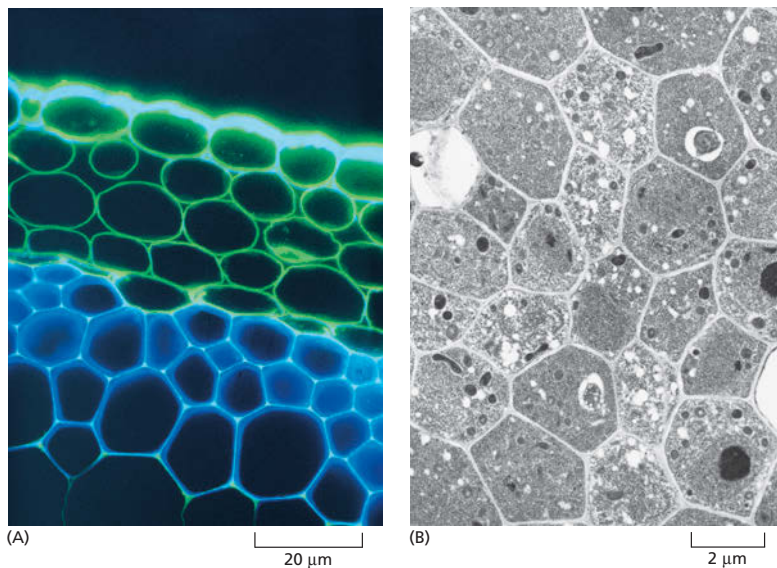



Figura 20-3 Os tecidos vegetais são reforçados pela parede celular. (A) Secção transversal de parte de um caule de *Arabidopsis* corada com corantes fluorescentes que marcam dois componentes diferentes da parede celular. A celulose em *azul* e um outro polissacarídeo (a pectina) em *verde*. As células não são coradas e estão invisíveis nessa preparação. As regiões ricas em celulose e pectina aparecem em branco. A pectina predomina nas camadas externas de células, as quais possuem apenas a parede celular primária (depositada durante o crescimento celular). A celulose é mais abundante nas camadas internas, as quais possuem parede celular secundária mais rígida e espessa (depositada após a finalização do crescimento celular). (B) As células e sua parede celular são vistas claramente nessa micrografia eletrônica de células jovens das raízes da mesma planta. (Cortesia de Paul Linstead.)

tes estão organizados de diferentes formas. Em alguns tecidos, como o osso ou o tendão, a matriz extracelular é abundante e essencial. Em outros tecidos, como o músculo ou a epiderme, a matriz extracelular é escassa, e os próprios citoesqueletos das células suportam a carga mecânica. Iniciaremos com uma breve discussão sobre as células e os tecidos vegetais antes de falarmos sobre os animais.

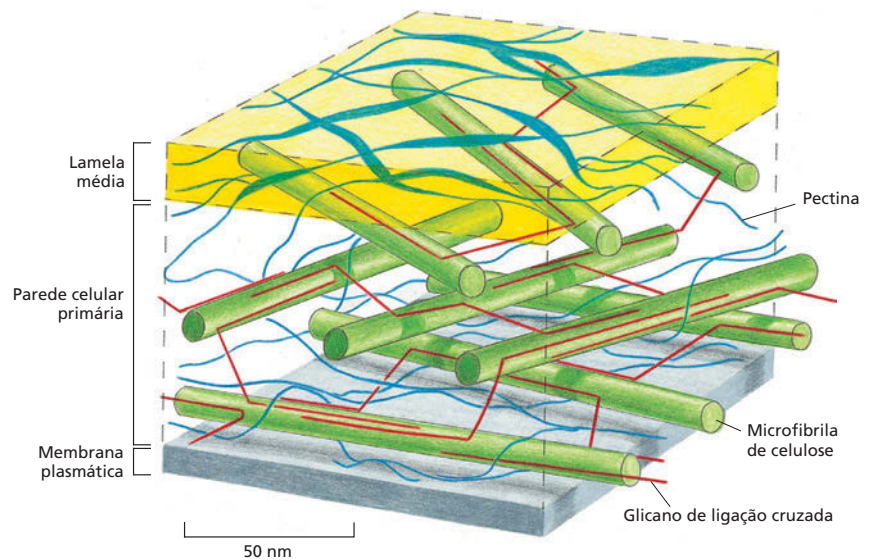
As células vegetais possuem paredes externas resistentes

Uma célula vegetal nua, cuja parede foi artificialmente retirada, é delicada e vulnerável. Com cuidado, ela pode ser mantida viva em cultura, mas pode ser facilmente rompida, e mesmo um pequeno desvio na osmolaridade do meio de cultura pode fazer com que ela inche e exploda. Seu citoesqueleto não possui os filamentos intermediários que resistem à tensão, como os encontrados nas células animais, e praticamente não apresenta resistência elástica. Portanto, a parede externa é essencial.

A parede celular vegetal deve ser resistente, mas não necessariamente rígida. O intumescimento osmótico da célula, limitado pela resistência da parede celular, pode manter a parede distendida, e uma massa dessas câmaras intumescidas unidas formam um tecido semirrígido (**Figura 20-4**), como no caso de uma alface tenra. Se faltar água, as células encolhem, e as folhas murcham.

Figura 20-4 Micrografia eletrônica de varredura mostrando as células de uma folha de alface tenra. As células intumescidas pela pressão osmótica são mantidas unidas por suas paredes celulares. (Cortesia de Kim Findlay.)

A maioria das células recém-formadas, em um vegetal multicelular, produz inicialmente uma fina *parede celular primária* capaz de expandir lentamente para acomodar o crescimento celular subsequente. A força que coordena o crescimento é a mesma que mantém a folha de alface tenra, a pressão de intumescimento, denominada pressão de turgor, que se desenvolve em virtude de um desequilíbrio osmótico entre o interior da célula e sua vizinhança (discutido no Capítulo 12). Uma vez que o crescimento cessa e a parede celular não precisa mais expandir, uma *parede celular secundária* é frequentemente produzida pelo espessamento da parede primária ou pela deposição de novas camadas com diferentes composições abaixo das camadas mais antigas. Quando as células vegetais se tornam especializadas, elas em geral produzem tipos de parede especialmente adaptados: cerosa, com paredes à prova de água para as células epidermais da superfície da folha; paredes duras, espessas e lenhosas para as células do xilema do caule, e assim por diante.

Figura 20-5 Modelo em escala mostrando a porção da parede primária da célula vegetal. As *barras verdes* representam as microfibrilas de celulose que proporcionam a força elástica, outros polissacarídeos fazem a ligação cruzada das microfibrilas de celulose (*fitas vermelhas*), enquanto a pectina preenche os espaços entre elas (*fitas azuis*), fornecendo resistência à compressão. A lamela média (em *amarelo*) é rica em pectina e é a camada que cimenta uma parede celular à outra.

As microfibrilas de celulose conferem a resistência à tração da parede celular das células vegetais

Como as matrizes celulares, a parede celular dos vegetais obtêm sua força elástica das longas fibras orientadas ao longo das linhas de estresse. Nas plantas superiores, as longas fibras são geralmente compostas pelo polissacarídeo *celulose*, a macromolécula orgânica mais abundante do planeta. Essas **microfibrilas de celulose** são entrelaçadas com outros polissacarídeos e algumas proteínas estruturais, todas unidas para formar uma estrutura complexa que resiste à compressão e tensão (**Figura 20-5**). No tecido lenhoso, uma rede de *lignina* (que não é um polissacarídeo ou uma proteína, mas um polímero diferente) é depositada dentro da matriz para torná-la mais rígida e à prova de água.

Para que a célula vegetal cresça ou mude sua forma, a parede celular tem de esticar ou deformar. Em virtude da resistência ao estiramento das microfibrilas de celulose, sua orientação governa a direção na qual a célula em crescimento irá aumentar. Se, por exemplo, elas estão organizadas circunferencialmente como em um cinto, a célula crescerá de modo mais fácil em comprimento do que em circunferência (**Figura 20-6**). Controlando a forma como sua parede é depositada, a célula vegetal controla sua própria forma e assim a direção do crescimento do tecido ao qual pertence.

Figura 20-6 A orientação das microfibrilas de celulose na parede celular vegetal influencia a direção do alongamento da célula. As células em (A) e (B) iniciam com formas idênticas (aqui mostradas como cubos), mas com diferentes orientações das microfibrilas de celulose em suas paredes. Embora a pressão de turgor seja uniforme em todas as direções, cada célula tende a alongar em uma direção perpendicular à orientação das microfibrilas, as quais possuem grande força elástica. A forma final de um órgão, como um broto, é determinada pela direção na qual as células se expandem.

A celulose é produzida de forma radicalmente diferente da maioria das outras macromoléculas extracelulares. Em vez de serem produzidas no interior das células e depois exportadas por exocitose (discutido no Capítulo 15), a celulose é sintetizada na superfície externa da célula por um complexo enzimático embebido na membrana plasmática. Esses transportam os monômeros de açúcar através da membrana e a incorporam em uma série de cadeias de polímeros em crescimento nos seus pontos de ligação com a membrana. Cada conjunto de cadeias forma uma microfibrila de celulose. O complexo enzimático se move na membrana, liberando novos polímeros, depositando uma trilha de microfibrilas de celulose orientadas.

Os caminhos seguidos pelos complexos enzimáticos dirigem a orientação na qual a celulose é depositada na parede celular, mas o que direciona o complexo enzimático? Logo abaixo da membrana plasmática, os microtúbulos estão alinhados exatamente como as microfibrilas de celulose do lado externo da célula (**Figura 20-7A**, **B**). Acredita-se que esses microtúbulos sirvam como caminho para guiar o movimento dos complexos enzimáticos (Figura 20-7C). Nessa forma

Figura 20-7 Os microtúbulos dirigem a deposição de celulose na parede celular vegetal. (A) Microscopia eletrônica das microfibrilas de celulose orientadas na parede celular vegetal. (B) Microtúbulos orientados logo abaixo da membrana plasmática da célula vegetal. (C) Um modelo de como a orientação das microfibrilas de celulose recém-depositadas na porção extracelular pode ser determinada pela orientação dos microtúbulos intracelulares. O grande complexo de enzimas *celulose-sintase* são proteínas integrais da membrana que sintetizam as microfibrilas de celulose continuamente na porção externa da membrana plasmática. As extremidades externas das microfibrilas se tornam integradas na textura da parede, e seu alongamento na outra extremidade empurra o complexo sintase ao longo do plano da membrana. Uma grande variedade de microtúbulos está ligada à membrana plasmática de modo que mantém o complexo enzimático confinado aos caminhos definidos na membrana, a orientação dos microtúbulos determina a direção na qual as microfibrilas serão depositadas. (A, cortesia de Brian Wells e Keith Roberts; B, cortesia de Brian Gunning).

curiosamente indireta, o citoesqueleto controla a forma da célula vegetal e a modelagem dos tecidos vegetais. Veremos que as células animais usam seu citoesqueleto para controlar a arquitetura dos tecidos de forma muito mais direta.

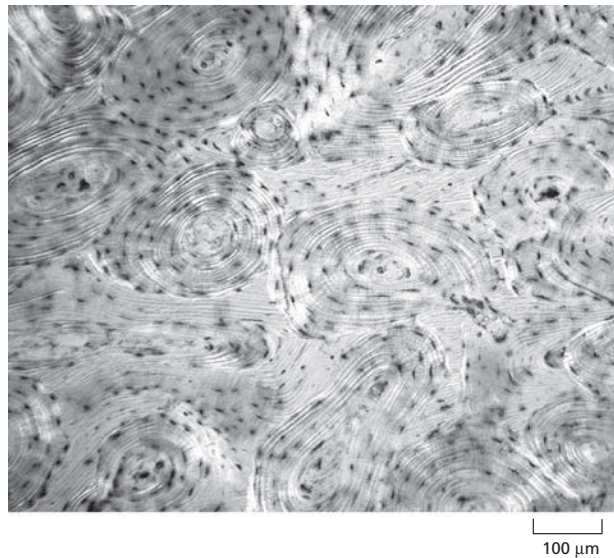
QUESTÃO 20-1

As células da raiz de uma semente que está crescendo no escuro orientam seus microtúbulos horizontalmente. Como você acha que isso afetará o crescimento da planta?

O tecido conjuntivo dos animais consiste principalmente em matriz extracelular

Tradicionalmente são distinguidos quatro principais tipos de tecidos animais: o conectivo, o epitelial, o nervoso e o muscular. A diferença na arquitetura básica ocorre entre o tecido conectivo e os demais. No **tecido conectivo**, a matriz extracelular é abundante e suporta a força mecânica. Nos outros tecidos, como o epitelial, a matriz extracelular é escassa, e as células são unidas diretamente umas às outras, e elas mesmas suportam a força mecânica. Veremos primeiro o tecido conectivo.

Os tecidos conectivos animais são consideravelmente variáveis. Eles podem ser rígidos e flexíveis, como os tendões ou a derme, duros e densos, como os ossos, elástico e com capacidade de absorver choques, como a cartilagem, ou macios e transparentes, como a gelatina, que preenche o interior dos olhos. Em

Figura 20-8 A matriz extracelular é repleta de tecido conectivo como o osso. As células nesta secção transversal de osso parecem pequenos objetos escuros semelhantes a formigas embebidas na matriz óssea, a qual ocupa a maioria do volume do tecido e fornece toda sua força mecânica. As faixas claras e escuras alternadas são as camadas de matriz contendo o colágeno orientado (que se torna visível com o auxílio de luz polarizada). Os cristais de fosfato de cálcio, que preenchem os interstícios entre as fibrilas de colágeno, tornam a matriz óssea resistente à compressão e a tensão, como um concreto reforçado.

todos esses exemplos, a maioria do tecido é ocupada pela matriz extracelular, e as células que produzem a matriz estão espalhadas em seu interior como passas em um pudim (Figura 20-8). Em todos esses tecidos, a resistência elástica, seja forte ou fraca, é conferida não por um polissacarídeo, como nos vegetais, mas por uma proteína fibrosa, o colágeno. Os vários tipos de tecido conectivo devem suas características específicas ao tipo de colágeno que contêm a sua quantidade e, mais importante, a outras moléculas que estão entrelaçadas em proporções variáveis. Essas incluem a elastina, uma proteína elástica que confere às artérias a resistência aos pulsos sanguíneos, bem como acomoda moléculas polissacarídicas especializadas, que discutiremos em breve.

O colágeno fornece a resistência à tração do tecido conectivo dos animais

O **colágeno** é encontrado em todos os tecidos animais multicelulares e de diversos tipos. Os mamíferos possuem cerca de 20 genes diferentes de colágeno codificando formas variantes do colágeno necessário a diferentes tecidos. Os colágenos são as proteínas mais importantes no osso, no tendão e na pele (o couro é puro colágeno) e constituem 25% do total da massa proteica dos mamíferos, mais do que qualquer outro tipo de proteína.

O aspecto característico de uma típica molécula de colágeno é sua estrutura longa e resistente, helicoidal de tripla-hélice, na qual três cadeias polipeptídicas de colágeno se enroscam uma na outra como uma corda (ver Figura 4-25A). Essas moléculas por sua vez se reúnem em polímeros organizados denominados fibrilas de colágeno, os quais são finos cabos de 10-300 nm de diâmetro e muitos micrômetros de comprimento. Esses podem unir-se em fibras colágenas ainda mais grossas (Figura 20-9). Outras moléculas de colágeno decoram a superfície das fibrilas de colágeno e ligam as fibrilas umas às outras e aos outros componentes da matriz extracelular.

As células do tecido conectivo que produzem e habitam a matriz recebem vários nomes de acordo com o tecido. Na pele, nos tendões e em outros tecidos conectivos, são chamados de **fibroblastos** (Figura 20-10), nos ossos são denominados *osteoblastos*. Elas produzem tanto o colágeno quanto outros componentes orgânicos da matriz. Quase todas essas moléculas são sintetizadas intracelularmente e então secretadas na forma-padrão, por exocitose (discutido no Capítulo 15). Fora das células, elas se reúnem em grandes agregados coesivos. Se a união ocorrer prematuramente, antes da secreção, a célula se torna

QUESTÃO 20-2

As mutações nos genes que codificam o colágeno frequentemente apresentam consequências prejudiciais, resultando em doenças incapacitantes severas. Mutações particularmente devastadoras são aquelas que alteram as glicinas, necessárias a cada três posições na cadeia polipeptídica do colágeno de maneira que possa formar o bastão característico em forma de tripla-hélice (ver Figura 20-9).

A. Você acha que as mutações no colágeno serão incapacitantes somente se uma das duas cópias do gene do colágeno for alterada?

B. Uma observação intrigante é que a alteração de um resíduo de glicina por outro aminoácido será mais incapacitante se ocorrer na região mais aminoterminal do domínio que forma o bastão. Sugira uma explicação para isso.

Figura 20-9 As fibrilas de colágeno estão organizadas em feixes. O desenho mostra as etapas da reunião do colágeno, a partir das cadeias polipeptídicas individuais, à formação da molécula de colágeno de três fitas, então às fibrilas e, finalmente, às fibras. A micrografia eletrônica mostra o colágeno completamente formado no tecido conectivo da pele de um embrião de galinha. As fibrilas estão organizadas em feixes (fibras), algumas na direção do plano do corte, outras em ângulos retos. A célula na fotografia é um fibroblasto, que secreta o colágeno e outros componentes da matriz extracelular. (Fotografia de C. Ploetz *et al.*, *J. Struct. Biol.* 106: 73-81, 1991. Com permissão de Elsevier.)

obstruída com seus próprios produtos. No caso do colágeno, as células evitam esse risco secretando moléculas de colágeno na forma precursora denominada pró-colágeno, com peptídeos adicionais em cada extremidade que impedem a reunião em fibrilas de colágeno. Enzimas extracelulares, denominadas proteinases pró-colágeno, clivam esses domínios terminais, permitindo a união somente após as moléculas terem saído para o espaço extracelular.

Algumas pessoas possuem um defeito genético em uma dessas proteinases ou no próprio pró-colágeno, e suas fibrilas de colágeno não podem unir-se corretamente. Como resultado, a pele e vários tecidos conectivos possuem pouca resistência à tração e são extraordinariamente elásticas (**Figura 20-11**).

As células nos tecidos devem ser capazes de degradar a matriz, bem como de produzi-la. Isso é essencial para o crescimento, a renovação e o reparo do tecido, e também é importante quando as células migratórias, como os macrófagos, necessitam escavar através do espesso colágeno e de outros polímeros da matriz extracelular. As proteases da matriz que clivam as proteínas extracelulares possuem um papel importante em muitas doenças, variando da artrite, onde contribuem com a quebra da cartilagem nas articulações afetadas, até o câncer, onde auxiliam as células cancerosas a invadir os tecidos normais.

Figura 20-10 Os fibroblastos produzem a matriz extracelular do tecido conectivo. A micrografia eletrônica de varredura mostra os fibroblastos e o colágeno do tecido conectivo da córnea de um rato. Outros componentes que, normalmente, formam um preenchimento gelatinoso hidratado entre os espaços das fibrilas de colágeno foram removidos por tratamento enzimático e ácido. (De T. Nishida *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29:1887-1890, 1988. Com permissão de ARVO.)

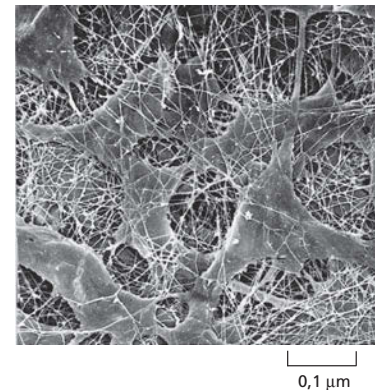



Figura 20-11 A montagem inadequada do colágeno pode causar uma hiperelasticidade da pele. James Morris, "o homem da pele elástica", em uma fotografia tirada em 1890. A pele anormalmente elástica é resultado de uma síndrome genética resultante de um defeito na reunião, ou ligações cruzadas, das moléculas de colágeno. Em alguns indivíduos, isso ocorre em virtude da falta de colagenase que converte o pró-colágeno em colágeno.

As células organizam o colágeno que secretam

Para realizarem suas funções, as fibrilas de colágeno devem estar alinhadas corretamente. Na pele, por exemplo, elas estão tramadas ou em camadas alternadas em diferentes orientações para resistir às forças de estresse elástico em múltiplas direções (**Figura 20-12**). Nos tendões, que ligam os músculos aos ossos, elas estão alinhadas em feixes paralelos ao longo do principal eixo de tensão.

As células do tecido conectivo controlam essa orientação, parcialmente depositando o colágeno de forma orientada e parcialmente rearranjando-o depois. Durante o desenvolvimento dos tecidos, os fibroblastos trabalham o colágeno que secretam, arrastando-se sobre ele e puxando-o, auxiliando na sua compactação em camadas e delineando os feixes. Esse papel mecânico dos fibroblastos no modelamento da matriz de colágeno foi demonstrado em cultura de células. Quando os fibroblastos são misturados com uma rede de fibrilas de colágeno orientadas ao acaso, formando um gel nas placas de cultura, os fibroblastos puxam a rede para sua vizinhança, compactando-o. Se dois pequenos pedaços de tecido embrionário contendo fibroblasto são colocados em um gel de colágeno distantes um do outro, o colágeno interposto se torna organizado em uma densa banda de fibras alinhadas que conectam os dois fragmentos de tecido (**Figura 20-13**). Os fibroblastos migram para fora dos fragmentos de tecido ao longo das fibras alinhadas. Assim, os fibroblastos influenciam o alinhamento das fibras de colágeno, e, por sua vez, as fibras de colágeno afetam a distribuição dos fibroblastos. Provavelmente, os fibroblastos desempenham um papel similar na geração da matriz extracelular de longo alcance no interior do organismo, auxiliando na formação dos tendões, por exemplo, e das densas e resistentes camadas de tecido conectivo que envolvem e conectam a maioria dos órgãos. A migração dos fibroblastos também é importante na cicatrização de feridas (**Animação 20.1**).

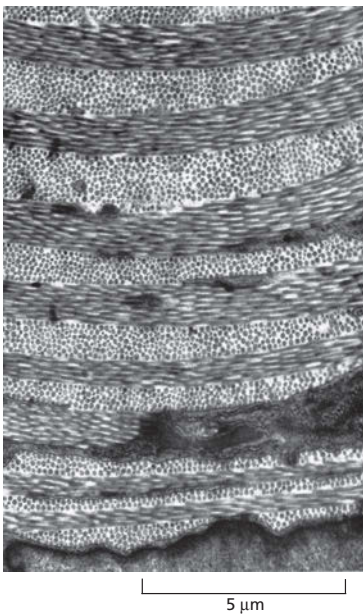



Figura 20-12 As fibrilas de colágeno da pele estão organizadas em um padrão semelhante a um compensado. Camadas sucessivas de fibrilas são depositadas quase em ângulos retos umas com as outras (ver também Figura 20-9). A micrografia eletrônica de uma secção transversal da pele de um girino. Essa organização é também encontrada no osso maduro e na córnea. (Cortesia de Jerome Gross.)

As integrinas unem a matriz externa de uma célula com o citoesqueleto interno

Se as células empurram e se arrastam sobre a matriz, elas devem ser capazes de se ligarem a ela. As células não se ligam bem ao colágeno desguarnecido. Outra proteína de matriz extracelular, a **fibronectina**, fornece a ligação. Uma parte da molécula de fibronectina se liga ao colágeno, e a outra forma um sítio de ligação para a célula (**Figura 20-14A**).

As células se ligam a sítios específicos na fibronectina por uma proteína receptora denominada **integrina**, que se estende na membrana plasmática celular. Enquanto o domínio extracelular da integrina se liga à fibronectina, o domínio intracelular (por uma série de moléculas adaptadoras) se liga aos filamentos de actina do interior da célula (Figura 20-14C). Graças a esse ancoramento, em vez de serem rompidas da fina bicamada lipídica em um momento de tensão entre as células e a matriz, as moléculas de integrina transmitem o estresse da matriz para o citoesqueleto.

As integrinas fazem mais do que transmitir o estresse passivamente, elas também reagem ao estresse e a sinais químicos de dentro para fora da célula controlando se elas irão manter sua ligação a outras moléculas ou se serão liberadas. As integrinas formam e desfazem ligações, por exemplo, quando as células se movem sobre um tecido, prendendo-se à matriz na porção posterior e liberando-a na porção anterior (ver Figura 17-32).

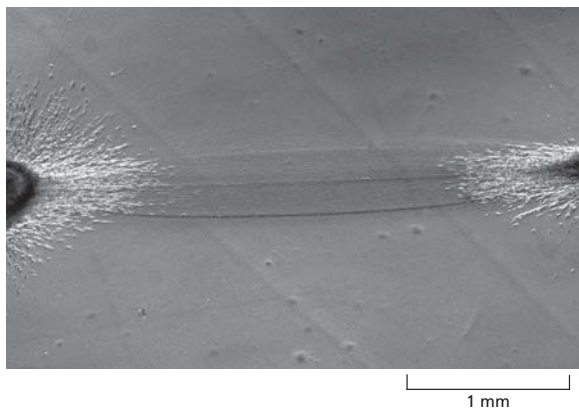



Figura 20-13 Os fibroblastos influenciam o alinhamento das fibras colágenas. Essa micrografia mostra a região entre dois pedaços do coração de um embrião de galinha (rico em fibroblasto, bem como as células do músculo cardíaco) cultivados em gel de colágeno por quatro dias. Uma densa região de fibras alinhadas de colágenos formadas entre os explantes, provavelmente porque os fibroblastos dos explantes puxam o colágeno. Nos outros locais da placa de cultura, o colágeno permanece desorganizado e desalinhado com aparência cinza uniforme. (De D. Stopak e A. K. Harris, *Dev. Biol.* 90:383-398, 1982. Com permissão de Elsevier.)

As integrinas desempenham essas funções sofrendo mudanças conformacionais. A ligação a uma molécula em um lado da membrana faz com que a molécula de integrina passe a um estado estendido e ativado, de modo que possa prender outra molécula do lado oposto, um efeito que atua nas duas direções através da membrana (**Figura 20-15**).

Essas mudanças conformacionais nas integrinas são usadas para transmitir sinais químicos e mecânicos através da membrana celular. Uma molécula intracelular pode ativar a integrina dentro da célula, fazendo com que ela possa atingir e prender uma estrutura extracelular. A ligação a uma estrutura externa pode ativar uma cascata de sinalização intracelular por meio das proteína-cinases que se associam à extremidade intracelular da molécula de integrina. Dessa maneira, as ligações externas realizadas pelas células auxiliam a regular se elas irão morrer ou sobreviver e, se sobreviver, se irão crescer, dividir ou diferenciar.

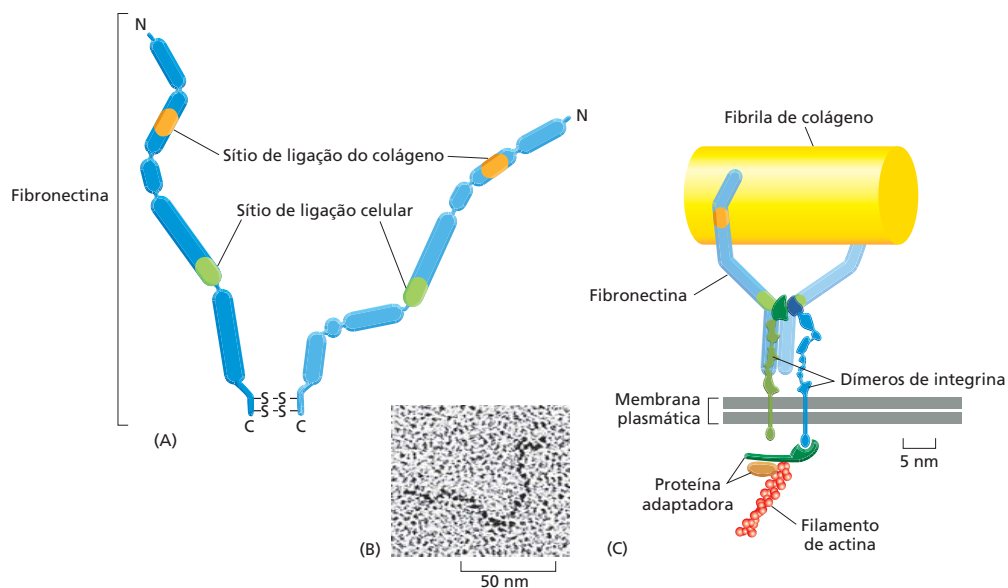
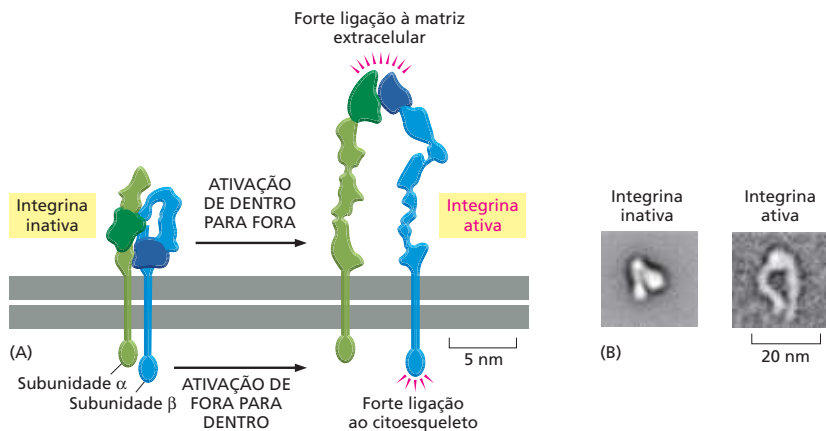



Figura 20-14 As moléculas de integrina e fibronectina ligam a célula à matriz extracelular. As moléculas de fibronectina do lado externo da célula se ligam às fibrilas de colágeno. As integrinas da membrana celular ligam as fibronectinas, prendendo-as ao citoesqueleto, no interior da célula. (A) Diagrama e (B) micrografia eletrônica de uma molécula de fibronectina. (C) Ligação transmembrana mediada por uma molécula de integrina (dímero *azul* e *verde*). A molécula de integrina transmite tensão através da membrana plasmática. Ela está ancorada internamente ao citoesqueleto e, externamente, através da fibronectina, à matriz extracelular. A membrana plasmática não tem de ser forte. A integrina, aqui apresentada, liga a fibronectina a um filamento de actina no interior da célula, mas outras integrinas conectam diferentes proteínas extracelulares ao citoesqueleto (normalmente aos filamentos de actina, mas algumas vezes aos filamentos intermediários). (B, de J. Engel *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150:97-120, 1981. Com permissão de Elsevier.)

Figura 20-15 Uma molécula de integrina passa para uma conformação ativa quando uma molécula se liga a uma de suas extremidades. (A) A molécula de integrina consiste em duas subunidades diferentes, α e β, e pode mudar de uma forma dobrada inativa para uma forma estendida e ativa. A mudança para o estado ativado pode ser deflagrada por meio da ligação a uma molécula da matriz extracelular (como a fibronectina) ou a proteínas intracelulares que a ligam ao citoesqueleto. De qualquer modo, as mudanças conformacionais alteram as moléculas de modo que sua extremidade oposta forma rapidamente uma ligação equilibrada à estrutura adequada. Dessa maneira, a integrina cria uma ligação mecânica que atravessa a membrana. (B) Micrografia eletrônica de uma única molécula de integrina, mostrando como ocorre a mudança de forma em resposta a um pequeno peptídeo que mimetiza um ligante extracelular ao qual a integrina se liga (o peptídeo é muito pequeno para ser visível). (A, com base em T. Xiao *et al.*, *Nature* 432:59-67, 2004. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.; B, de J. Takagi *et al.*, *Cell* 110:599-611, 2002. Com permissão de Elsevier.)

O homem produz pelo menos 24 tipos distintos de integrinas, que reconhecem diferentes estruturas extracelulares e possuem distintas funções dependendo do tipo de células onde são encontradas. Por exemplo, as integrinas auxiliam na migração dos leucócitos para fora dos vasos sanguíneos em direção ao local de infecção para combater os micro-organismos. Indivíduos que não possuem este tipo de integrina desenvolvem uma doença denominada *deficiência na adesão de leucócitos* e sofrem de repetidas infecções bacterianas. Uma forma diferente de integrina é encontrada nas plaquetas. Indivíduos que não possuem essa integrina sangram excessivamente, porque suas plaquetas não podem ligar-se aos fatores de coagulação necessários na matriz extracelular.

Géis de polissacarídeos e proteínas preenchem os espaços e resistem à compressão

Enquanto o colágeno confere força elástica para resistir à tensão, um grupo completamente diferente de macromoléculas na matriz extracelular dos tecidos animais fornece a função complementar, resistindo à compressão e preenchendo o espaço. Esses são os **proteoglicanos**, proteínas extracelulares ligadas a uma classe especial de polissacarídeos complexos negativamente carregados, os **glicosaminoglicanos** (**GAGs**) (Figura 20-16). Os proteoglicanos são extremamente diversos em tamanho, forma e química. Tipicamente, muitas cadeias GAG são ligadas a uma única proteína central, a qual pode, por sua vez, estar ligada pela outra extremidade a outro GAG, criando uma enorme macromolécula semelhante a uma escova de garrafas, com peso molecular de milhões de dáltons (Figura 20-17).

Nos tecidos conectivos densos e compactos, como os tendões e os ossos, a proporção de GAG é pequena, e a matriz é composta quase que exclusivamente de colágeno (ou, no caso dos ossos, de colágeno e cristais de fosfato

Figura 20-16 Os glicosaminoglicanos (GAGs) auxiliam a preencher o espaço da matriz extracelular do tecido conectivo. O hialuronano, um GAG relativamente simples, consiste em uma única cadeia longa de até 25.000 unidades de dissacarídeos repetidas, cada uma portando uma carga negativa. Como nos outros GAGs, um dos monômeros de açúcar em cada unidade de dissacarídeo é um amino-açúcar. Muitos GAGs possuem grupos laterais negativamente carregados, principalmente os grupos sulfatados.

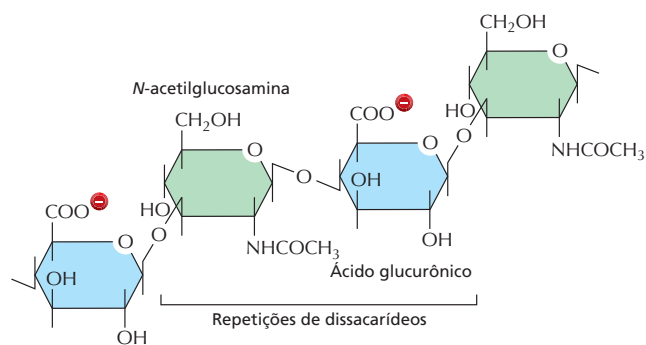
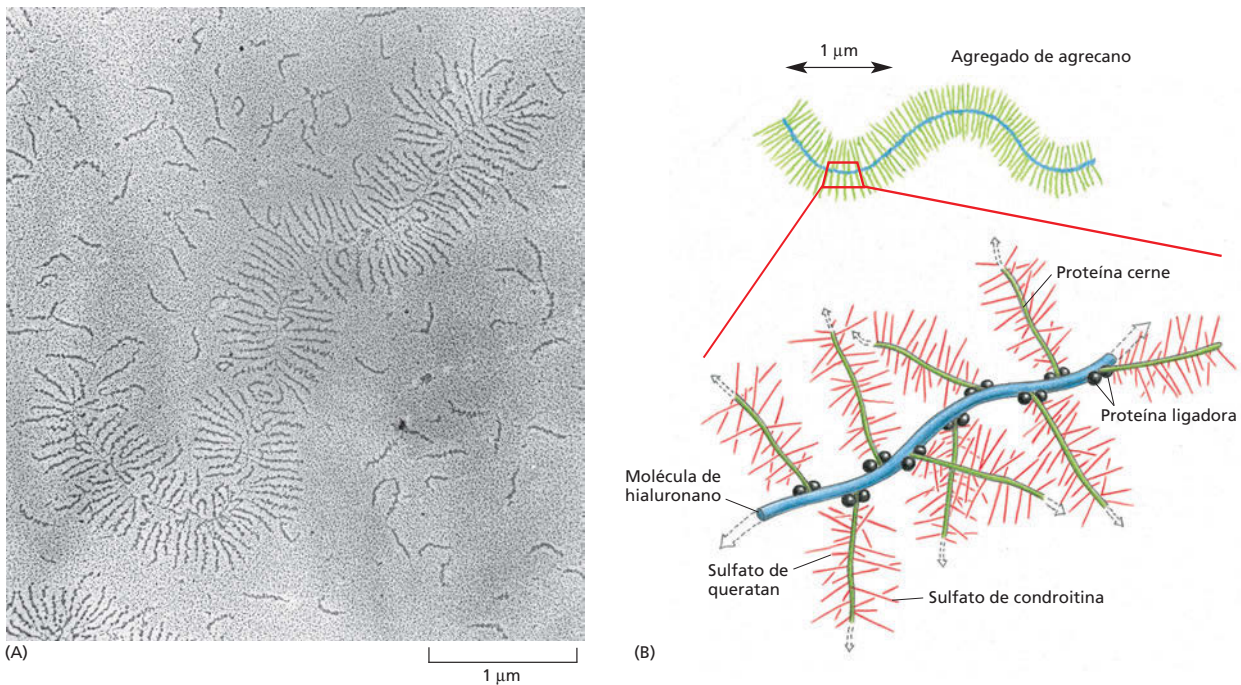



Figura 20-17 Os proteoglicanos e os GAGs podem formar grandes agregados. (A) Micrografia eletrônica de um agregado de cartilagem espalhado em uma superfície plana. Muitas subunidades livres, grandes moléculas de proteoglicanos, também podem ser visualizadas. (B) Desenho esquemático mostrando como as proteínas (em *verde* e *preto*) e os GAGs (em *vermelho* e *azul*) formam um agregado gigante como ilustrado em (A). O peso molecular de tal complexo pode ser de 10^8 dáltons ou mais e ocupa um volume equivalente ao de uma bactéria, o qual é cerca de 2×10^{-12} cm^3. (Cortesia de Lawrence Rosenberg.)

de cálcio). No outro extremo, a substância semelhante a um gel do interior dos olhos consiste quase que exclusivamente em um tipo específico de GAG, juntamente com água, com apenas uma pequena quantidade de colágeno. Em geral, os GAGs são bastante hidrofílicos e tendem a adotar conformações extremamente estendidas que ocupam um grande volume com relação à sua massa (ver Figura 20-17). Eles formam géis mesmo em concentrações muito baixas, suas múltiplas cargas negativas atraem uma nuvem de cátions, como o Na^+, que são osmoticamente ativos, fazendo com que grandes quantidades de água sejam sugadas para a matriz. Isso cria uma pressão de intumescência que é equilibrada pela tensão nas fibras de colágeno que estão entrelaçadas com os proteoglicanos. Quando a matriz é rica em colágeno e grandes quantidades de GAG são aprisionadas nessa trama, as pressões de intumescência e a tensão de contrabalanço são enormes. Tal matriz é forte, elástica e resistente à compressão. A matriz da cartilagem que reveste as articulações do joelho, por exemplo, apresenta essa característica: pode suportar pressões de centenas de quilos por centímetro quadrado.

Os proteoglicanos desempenham muitas funções sofisticadas, além de fornecer um espaço hidratado ao redor das células. Eles podem formar géis e poros de tamanho e densidade de carga variados que atuam como filtros para regular a passagem de moléculas para o meio extracelular. Eles podem ligar fatores de crescimento e outras proteínas que atuam como sinais para as células. Eles podem bloquear, apoiar ou guiar a migração celular pela matriz. De qualquer maneira, os componentes da matriz influenciam o comportamento das células, frequentemente as mesmas células que produziram a matriz, uma interação recíproca que tem importantes efeitos na diferenciação celular. Há muito ainda a ser descoberto a respeito de como as células formam esse tapete de moléculas de matriz e como as mudanças químicas que elas deixam nessa fábrica atuam e são organizadas.

QUESTÃO 20-3

Os proteoglicanos são caracterizados pela abundância de cargas negativas nas suas cadeias de açúcares. Como as propriedades dessas moléculas difeririam se as cargas negativas não fossem abundantes?

CAMADAS EPITELIAIS E JUNÇÕES CELULARES

Há mais de 200 tipos celulares visivelmente diferentes no organismo vertebrado. A maioria é organizada em **epitélio**, onde estão juntas lado a lado formando camadas multicelulares. Em alguns casos, a camada possui muitas células de espessura, ou *estratificado*, como o epitélio que cobre a pele; em outros casos, apresentam somente uma camada de células, ou *epitélio simples*, como o que reveste o intestino. As células podem apresentar várias formas: ser altas e colunares, ou cuboides, ou achatadas e escamosas (**Figura 20-18**). Em uma mesma camada, elas podem ser todas iguais ou podem ser uma mistura dos diferentes tipos. Alguns epitélios, como a pele, podem simplesmente atuar como uma barreira protetora, outros podem exercer funções bioquímicas complexas. Alguns secretam produtos especializados, como hormônios, leite ou lágrimas, outros, como aqueles que revestem o intestino, podem absorver nutrientes. Alguns tipos epiteliais ainda podem detectar sinais, como os fotorreceptores do olho que detectam a luz, ou as células pilosas auditivas da orelha, que detectam o som. Apesar dessas e de outras variações, pode-se reconhecer uma série de padrões estruturais característicos compartilhados por quase todas as células epiteliais animais. A organização das células epiteliais é tão trivial que parece óbvio; no entanto, requer uma série de dispositivos especializados, como veremos, comuns a uma ampla variedade de diferentes tipos celulares.

O epitélio recobre a superfície externa do corpo e reveste todas as cavidades internas e deve ter sido uma característica precoce na evolução dos animais multicelulares. Sua importância é óbvia. As células são unidas em uma camada epitelial, criando uma barreira com a mesma significância para os organismos multicelulares que a membrana plasmática representa para uma única célula. Ela mantém algumas moléculas no interior e outras fora do organismo. Captura nutrientes e exporta resíduos. Ela contém receptores para os sinais ambientais e protege o interior do organismo dos microrganismos invasores e da perda de líquidos.

As camadas epiteliais são polarizadas e repousam na lâmina basal

Uma camada epitelial possui duas faces: a superfície **apical** é livre e está exposta ao ar ou a líquidos aquosos, a superfície **basal** repousa sobre outro tecido, normalmente o tecido conectivo, ao qual está ligada (**Figura 20-19**). Uma camada fina e resistente de matriz extracelular sustenta a superfície basal do epitélio e é denominada **lâmina basal** (**Figura 20-20**), composta por um tipo de colágeno especializado (colágeno tipo IV) e outras macromoléculas. Essas incluem uma proteína denominada *laminina*, a qual fornece os locais de adesão

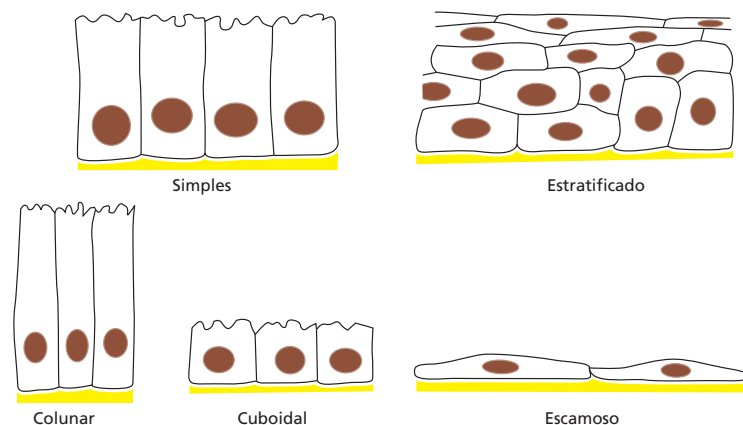



Figura 20-18 **As células podem ser unidas de diferentes maneiras para formar uma camada epitelial.** São apresentados cinco tipos básicos de epitélios.

para as moléculas de integrinas da membrana plasmática das células epiteliais, atuando como um ponto de ligação que se assemelha ao da fibronectina no tecido conectivo.

As faces basais e apicais de um epitélio são quimicamente diferentes, refletindo a organização interna polarizada de cada célula epitelial. Cada célula possui uma porção superior e uma inferior, com diferentes propriedades. Essa organização polarizada é crucial para a função epitelial. Considere, por exemplo, um epitélio simples colunar que reveste o intestino delgado dos mamíferos. Ele consiste, principalmente, em dois tipos celulares misturados, células de absorção, que capturam os nutrientes, e células caliciformes (assim denominada em virtude da sua forma), que secretam o muco que protege e lubrifica o revestimento do intestino (**Figura 20-21**). Os dois tipos celulares são polarizados. As células de absorção importam as moléculas nutritivas da superfície apical para o lúmen do intestino e exportam essas moléculas pela lâmina basal para os tecidos subjacentes. Para isso, eles necessitam de diferentes grupos de proteínas de transporte nas suas membranas plasmáticas basais e apicais (ver Figura 12-17). As células caliciformes também devem ser polarizadas, mas de maneira distinta. Elas devem sintetizar muco e então secretá-lo somente em sua extremidade apical (ver Figura 20-21). O aparelho de Golgi, as vesículas secretoras e o citoesqueleto estão organizados assimetricamente para que isso seja possível. Essa organização depende das junções que as células epiteliais formam umas com as outras e com a lâmina basal, a qual, por sua vez, controla a organização de um sistema elaborado de proteínas intracelulares associadas à membrana que coordenam a organização polarizada do citoplasma.

Superfície livre
APICAL
Lâmina basal
BASAL
Tecido conectivo

Figura 20-19 Uma camada de células epiteliais possui uma superfície apical e uma basal. A superfície basal se apoia sobre uma camada especializada de matriz extracelular denominada lâmina basal, e a superfície apical é livre.

As junções ocludentes tornam o epitélio impermeável e separam sua superfície apical e basal

As **junções celulares** epiteliais podem ser classificadas de acordo com sua função. Algumas fornecem uma vedação compacta para prevenir o vazamento de moléculas através do epitélio pelos espaços entre suas células. Algumas fornecem ligações mecânicas fortes, e outras, um tipo especial de íntima comunicação química. Na maioria do epitélio, todos esses tipos de junções estão presentes ao mesmo tempo (**Figura 20-22**). Cada tipo de junção é caracterizado por sua própria classe de proteínas de membrana que mantém as células unidas.

Figura 20-20 A lâmina basal sustenta a camada de células epiteliais. Micrografia eletrônica de varredura de uma lâmina basal da córnea de embrião de galinha. Algumas das células epiteliais foram removidas para expor a superfície superior da lâmina basal em forma de manto que parece uma onda em virtude do colágeno tipo IV e de proteínas lamininas. Uma rede de outras fibrilas de colágeno do tecido conectivo subjacente interage com a face inferior da lâmina. (Cortesia de Robert Trelstad.)

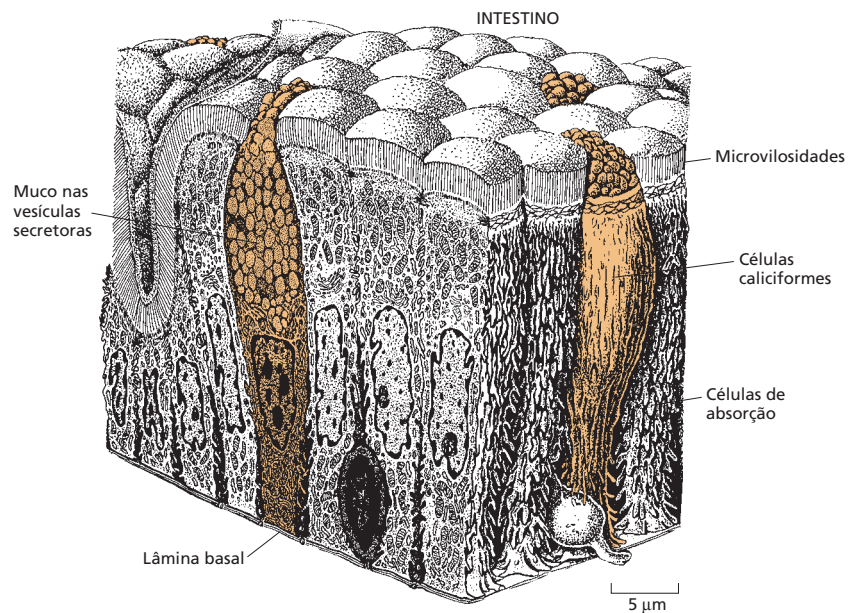
Figura 20-21 Tipos celulares funcionalmente polarizados revestem o intestino. As células de absorção, as quais capturam os nutrientes do intestino, estão imersas no revestimento do intestino com as células caliciformes (*marrom*), as quais secretam o muco para o intestino. As células de absorção são frequentemente chamadas de *células com borda em escova* em virtude da grande quantidade de microvilosidades na sua superfície apical, que servem para aumentar a área da membrana para o transporte de pequenas moléculas para a célula. As células caliciformes possuem forma de cálice em virtude da massa de vesículas secretoras que distendem sua região apical. (Adaptada de R. Krsti'c, Human Microscopic Anatomy. Berlim: Springer, 1991. Com permissão de Springer-Verlag.)

A função de vedação é desempenhada (nos vertebrados) pelas **junções ocludentes**, que vedam células vizinhas de modo que moléculas solúveis em água não podem passar facilmente entre elas. Se uma molécula marcada é adicionada a um lado da camada de células epiteliais, ela não irá passar pelas junções ocludentes (Figura 20-23). As junções ocludentes são formadas por proteínas denominadas *claudinas* e *ocludinas*, as quais estão organizadas em feixes ao longo das linhas das junções criando o lacre. Sem as junções ocludentes para prevenir vazamentos, as atividades de bombeamento das células de absorção como aquelas encontradas no intestino seriam inúteis, e a composição do meio extracelular seria a mesma nos dois lados do epitélio. Como vimos no Capítulo 11, as junções ocludentes também desempenham um papel importante na polaridade de cada célula epitelial. Primeiro, as junções ocludentes ao redor do anel apical de cada célula impedem a difusão de proteínas de membrana, mantendo o domínio apical da membrana plasmática diferente da membrana basal (ou baso-

Figura 20-22 Vários tipos de junções célula-célula são encontrados nos epitélios animais. As junções ocludentes são peculiares ao epitélio. Os outros tipos também ocorrem de forma modificada, em vários tecidos não epiteliais.

Nome	Função
Junção ocludente	Sela as células adjacentes em uma camada epitelial para prevenir o vazamento de moléculas entre elas
Junções aderentes	Ligam os feixes de actina de uma célula aos mesmos feixes da célula vizinha
Desmossomos	Ligam os filamentos intermediários de uma célula aos filamentos intermediários da célula vizinha
Junção tipo fenda	Permite a passagem de pequenas moléculas e íons solúveis em água para o citosol
Hemidesmossomos	Ancoram os filamentos intermediários de uma célula à lâmina basal

Figura 20-23 As junções ocludentes permitem que as camadas celulares atuem como uma barreira à difusão de solutos. (A) Desenho esquemático mostrando como uma pequena molécula marcadora adicionada em um lado da camada de células epiteliais não pode atravessar a junção ocludente que sela duas células adjacentes. (B) Micrografia eletrônica das células de um epitélio onde uma pequena molécula marcadora extracelular (corante *escuro*) foi adicionada à porção apical (à *esquerda*) ou basolateral (à *direita*). Nos dois casos, a molécula marcadora é detida pela junção ocludente. (C) Um modelo da estrutura da junção ocludente, mostrando como as células são seladas por proteínas denominadas claudinas e ocludinas (em *verde*) na porção externa da bicamada da membrana plasmática. (B, cortesia de Daniel Friend.)

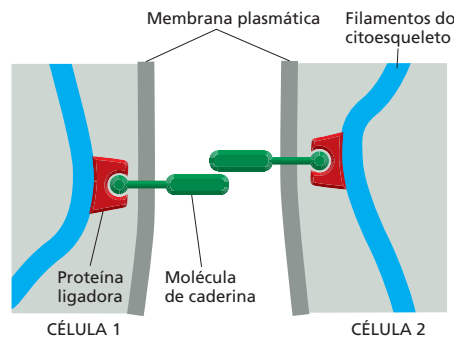
lateral) (ver Figura 11-34). Segundo, em muitos epitélios, as junções ocludentes são locais de reunião para os complexos de proteínas intracelulares que coordenam a polaridade apicobasal no interior das células.

As junções ligadas ao citoesqueleto unem firmemente as células epiteliais umas às outras e à lâmina basal

As junções que matêm o epitélio unido pela formação de ligações mecânicas são de três principais tipos. As *junções aderentes* e os *desmossomos* ligam uma célula epitelial à outra, enquanto os *hemidesmossomos* ligam as células epiteliais à lâmina basal. Todas essas junções fornecem força mecânica pela mesma estratégia que já vimos no tecido conectivo (ver Figura 20-14C): as moléculas que formam as adesões externas se estendem pela membrana e estão ligadas ao interior das células aos fortes filamentos do citoesqueleto. Dessa forma, os filamentos do citoesqueleto são presos em uma rede que se estende de uma célula à outra por toda a expansão do tecido epitelial.

As junções aderentes e os desmossomos são formados ao redor das proteínas transmembrana que pertencem à família das **caderinas**. A molécula de caderina da membrana plasmática de uma célula se liga diretamente a uma molécula de caderina idêntica na membrana plasmática da célula vizinha (**Figura 20-24**). Tais ligações entre moléculas semelhantes são denominadas ligações *homofílicas*. No caso das caderinas, a ligação requer a presença de Ca^{2+} no meio extracelular, por isso, o nome.

Nas **junções aderentes**, cada molécula de caderina está presa dentro de sua célula por meio de várias proteínas ligadoras aos filamentos de actina. Frequentemente, as junções aderentes formam um cinturão de adesão contínuo ao redor de cada célula epitelial, próximo à porção apical da célula, logo abaixo das junções ocludentes (**Figura 20-25**). Os feixes de actina estão, então, conectados de uma célula à outra através do epitélio. Essa rede de actina é potencialmente contrátil e proporciona à camada epitelial a capacidade de desenvolver tensão

Figura 20-24 Moléculas de caderina fazem a mediação da ligação mecânica de uma célula à outra. Duas moléculas similares de caderina da membrana plasmática de células adjacentes se ligam uma à outra na região extracelular. Na porção intracelular, elas estão ligadas, por uma proteína ligadora, aos filamentos do citoesqueleto, que pode ser de actina ou queratina. Quando as células tocam umas nas outras, suas caderinas se concentram nesses pontos de ligação (**Animação 20.2**).

e mudar sua forma de maneira extraordinária. Encolhendo sua superfície apical ao longo do eixo, a camada pode dobrar-se sobre si mesma formando um tubo (**Figura 20-26A**). Alternativamente, encolhendo sua superfície apical ao longo dos eixos, pode formar uma depressão em forma de taça e eventualmente criar uma vesícula que pode destacar-se do restante do epitélio. Movimentos epiteliais como esses são importantes no desenvolvimento embrionário, onde criam estruturas como o tubo neural, o qual dá origem ao sistema nervoso central (Figura 20-26B), e as vesículas das lentes, que dão origem às lentes dos olhos (Figura 20-26C).

Por outro lado, os **desmossomos** – um grupo distinto de moléculas de caderina – estão ancorados dentro de cada célula. Essas caderinas se conectam aos filamentos intermediários, especificamente as queratinas, um tipo de filamento intermediário encontrado no epitélio (**Figura 20-27**). Feixes espessos de filamentos de actina, semelhantes a uma corda, cruzam o citoplasma e se soldam aos feixes de filamentos de queratina das células adjacentes através dos desmossomos. Esse arranjo confere grande força elástica à camada epitelial e são particularmente abundantes no epitélio resistente e exposto como o da epiderme.

As bolhas são um lembrete doloroso de que não é suficiente que as células epiteliais estejam ligadas fortemente umas às outras. Elas também devem estar ancoradas ao tecido subjacente. Como vimos anteriormente, o ancoramento

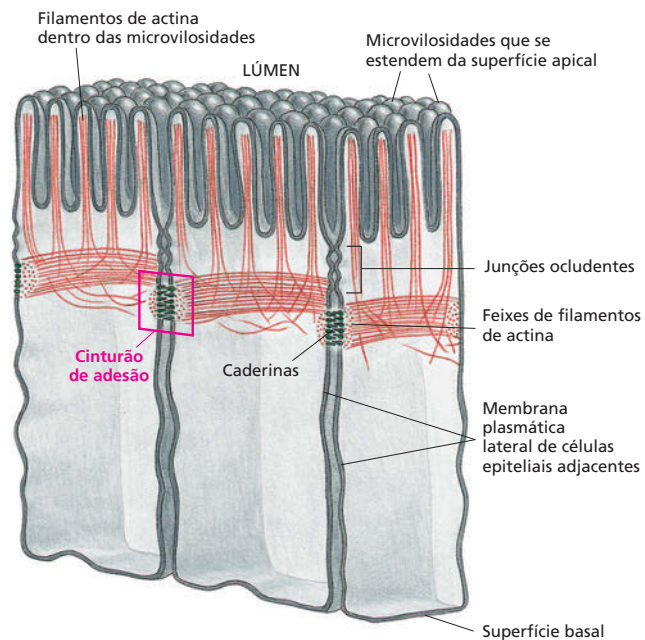
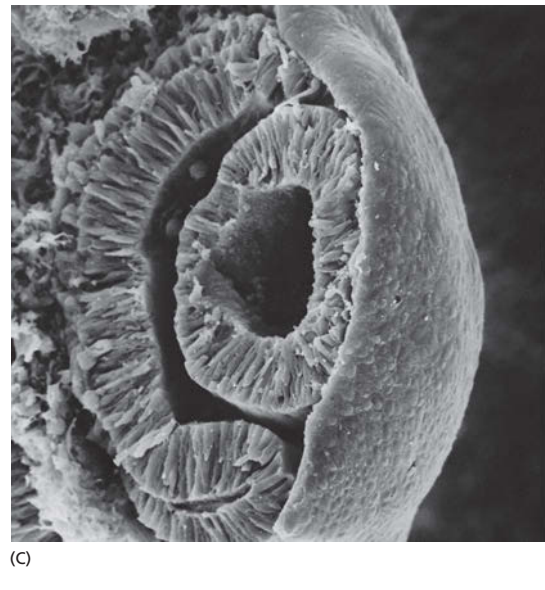
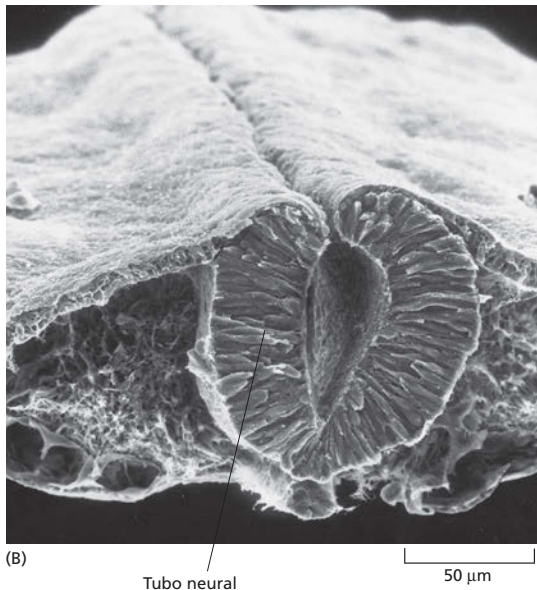
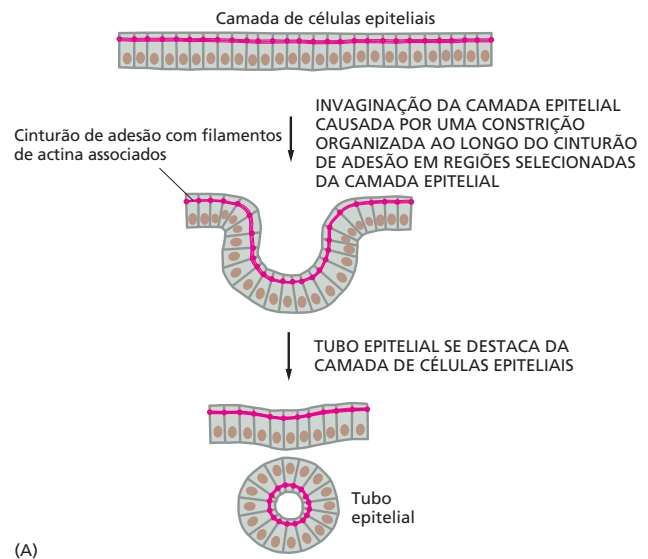
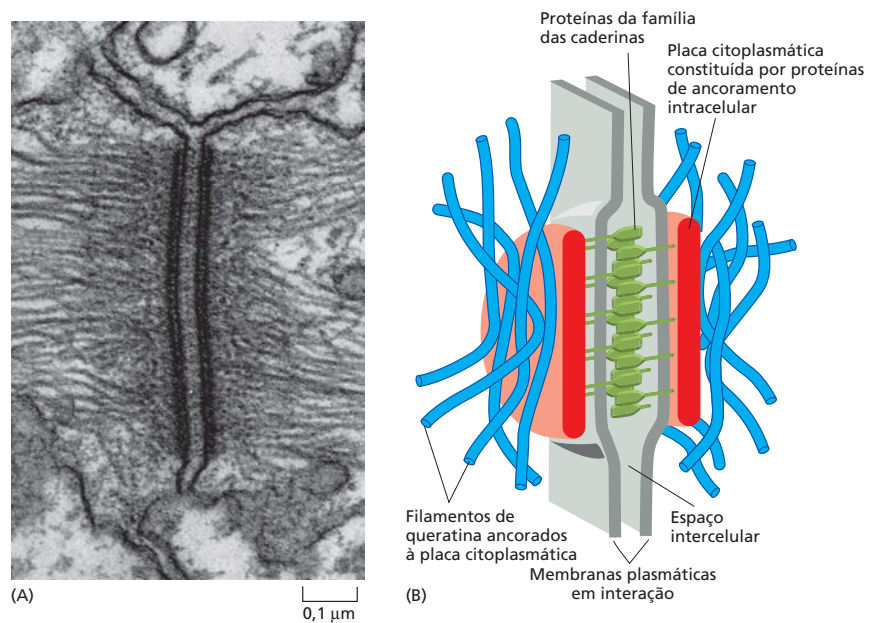



Figura 20-25 As junções aderentes formam cinturões de adesão ao redor das células epiteliais no intestino delgado. Um feixe contrátil de filamentos de actina se estende ao longo da superfície citoplasmática da membrana plasmática próximo ao ápice de cada célula, e esses feixes de filamentos de actina das células adjacentes estão ligados uns aos outros por moléculas de caderina que se estendem na membrana celular (ver Figura 20-24).

Figura 20-26 As camadas epiteliais podem ser dobradas para formar tubos ou vesículas. (A) Diagrama mostrando como a contração dos feixes apicais dos filamentos ligados de uma célula à outra pelas junções aderentes faz com que as células contraiam seus ápices. De acordo com a orientação da contração – ao longo de um eixo ou em todas as direções –, o epitélio pode enrolar-se em um tubo ou invaginar para formar uma vesícula. (B) Formação do tubo neural. A micrografia eletrônica de varredura mostra uma secção transversal do tronco de um embrião de galinha de dois dias. Parte da camada que recobre a superfície do embrião se tornou mais espessa e se enrolou formando um tubo pela contração apical e está quase se destacando para se separar da estrutura interna. (C) Formação da lente. Uma porção da superfície do epitélio que recobre o rudimento embrionário da retina do olho se tornou côncava e finalmente se destacou como uma vesícula separada – a vesícula da lente – no cálice do olho. (B, cortesia de Jean-Paul Revel; C, cortesia de K. W. Tosney.)

é mediado por proteínas integrinas da membrana plasmática basal das células epiteliais. Externamente, essas moléculas de integrinas se ligam à laminina da lâmina basal. Dentro das células, elas estão ligadas aos filamentos de queratina, criando uma estrutura que se parece com meio desmossomo. Essas ligações das células epiteliais à matriz extracelular são então chamadas de **hemidesmossomos** (Figura 20-28).

As junções tipo fenda permitem que íons e pequenas moléculas passem de uma célula à outra

O último tipo de junção celular epitelial, encontrado em quase todo o epitélio e em muitos outros tipos de tecidos, tem uma função completamente diferente. Ela é denominada **junção tipo fenda**. Ao microscópio eletrônico, ela aparece como uma região onde as membranas de duas células estão bem próximas e exatamente paralelas com um pequeno espaço de 2-4 nm entre elas (Figura 20-29A).

Figura 20-27 Os desmossomos ligam os filamentos de queratina de uma célula à outra. (A) Micrografia eletrônica de um desmossomo ligando duas células da epiderme de uma salamandra, mostrando a ligação dos filamentos de queratina. (B) Desenho esquemático de um desmossomo. Na superfície citoplasmática de cada membrana plasmática que interage, encontra-se uma densa placa composta por uma mistura de proteínas de ancoramento intracelulares. Um feixe de filamentos de queratina está ligado à superfície de cada placa. As proteínas de adesão transmembrana da família das caderinas se ligam à superfície externa de cada placa e interagem através de seus domínios extracelulares mantendo as células adjacentes unidas. (A, de D. E. Kelly, *J. Cell Biol.* 28:51-72, 1966. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

O espaço não é vazio, mas está preenchido com as extremidades protundentes de muitos complexos proteicos idênticos localizados na membrana das duas células opostas. Esses complexos, denominados *conexons*, formam canais através das duas membranas plasmáticas e estão alinhados de um lado ao outro formando uma estreita passagem que permite o movimento de íons inorgânicos e moléculas solúveis em água (com peso molecular de até 1.000 dáltons) entre o citoplasma das duas células (Figura 20-29B). Isso cria uma ligação metabólica e elétrica entre as duas células. As junções tipo fenda entre duas células de músculo estriado cardíaco, por exemplo, permitem que ondas elétricas de excitação se espalhem através do tecido. Essas ondas de excitação ativam a contração coordenada das células, produzindo batimentos cardíacos regulares.

As junções tipo fenda em muitos tecidos podem ser abertas ou fechadas de acordo com a necessidade de resposta aos sinais extracelulares. O neurotransmissor dopamina, por exemplo, reduz a comunicação da junção tipo fenda de uma classe de neurônios da retina em resposta ao aumento da intensidade da luz (**Figura 20-30**). Essa redução da permeabilidade da junção tipo fenda muda o padrão de sinalização elétrica e auxilia a retina a alternar o uso dos fotorreceptores bastonetes, os quais são ótimos detectores de luz baixa para o uso dos cones fotorreceptores, os quais detectam cor e detalhes finos com alta intensidade luminosa.

Curiosamente, os tecidos vegetais, embora não tenham todos os tipos de junções celulares já descritos, possuem um semelhante funcional à junção tipo fenda. O citoplasma das células vegetais adjacentes é conectado por pequenos

QUESTÃO 20-4

Os locais de contatos focais descritos no Capítulo 17 são análogos aos hemidesmossomos, os quais são locais onde as células se ligam à matriz extracelular. Essas junções são prevalentes nas células epiteliais, mas ausentes nos fibroblastos. Nos locais de contatos focais, as conexões intracelulares são compostas por filamentos de actina, ao passo que, nos hemidesmossomos, as conexões são realizadas por filamentos intermediários. Por que você acha que esses dois diferentes tipos celulares se ligam de modo distinto à matriz extracelular?

Figura 20-28 Os hemidesmossomos ancoram os filamentos de queratina de uma célula epitelial à lâmina basal. A ligação é mediada pelas proteínas integrinas.

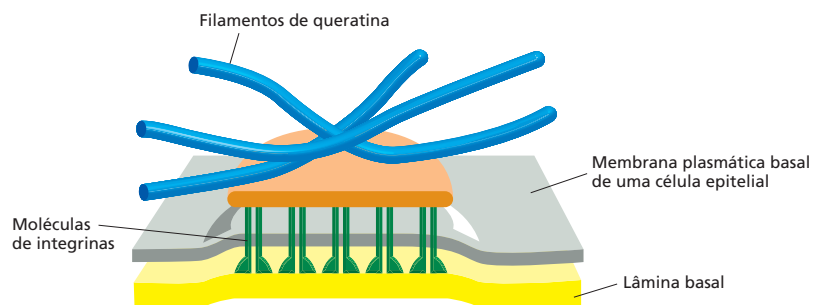
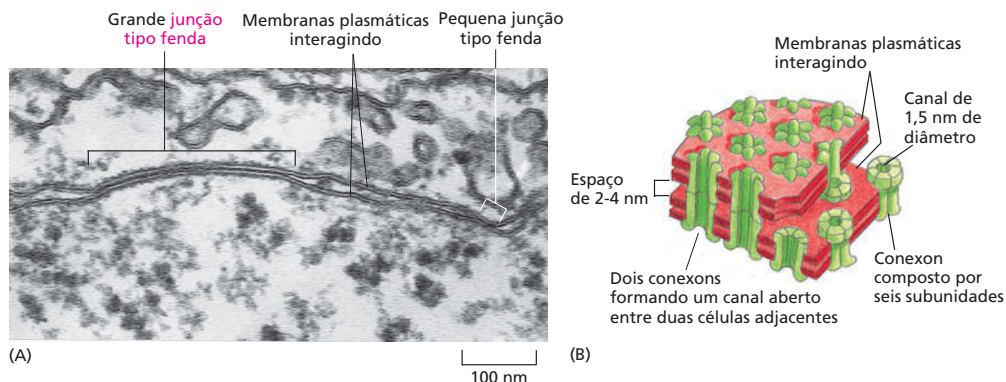



Figura 20-29 **As junções tipo fenda proporcionam uma comunicação direta entre duas células adjacentes.** (A) Micrografia eletrônica de camada delgada de uma junção tipo fenda entre duas células em cultura. (B) Modelo de uma junção tipo fenda. O desenho mostra a interação das membranas plasmáticas de duas células adjacentes. As bicamadas lipídicas opostas (em *vermelho*) são penetradas por proteínas agrupadas denominadas conexons (em *verde*), cada uma delas é formada por seis subunidades idênticas de proteínas. Dois conexons se ligam através do espaço intercelular formando um canal aquoso que conecta as duas células. (A, de N. B. Gilula, em Cell Communications [R.P. Cox. Ed.], p. 1-29. Nova York: Wiley, 1974. Com permissão de John Wiley & Sons, Inc.)

canais comunicantes denominados **plasmodesmata**, que se estendem pela parede celular (**Figura 20-31**). Ao contrário dos canais das junções tipo fenda, os plasmodesmata são canais citoplasmáticos revestidos com membrana plasmática, e assim, nos vegetais, em princípio, o citoplasma é contínuo de uma célula para outra. Íons, pequenas moléculas e mesmo macromoléculas como algumas proteínas e microRNAs podem passar pelos plasmodesmata, e o controle do tráfego dos reguladores de transcrição de uma célula para outra é importante para o desenvolvimento da planta.

QUESTÃO 20-5

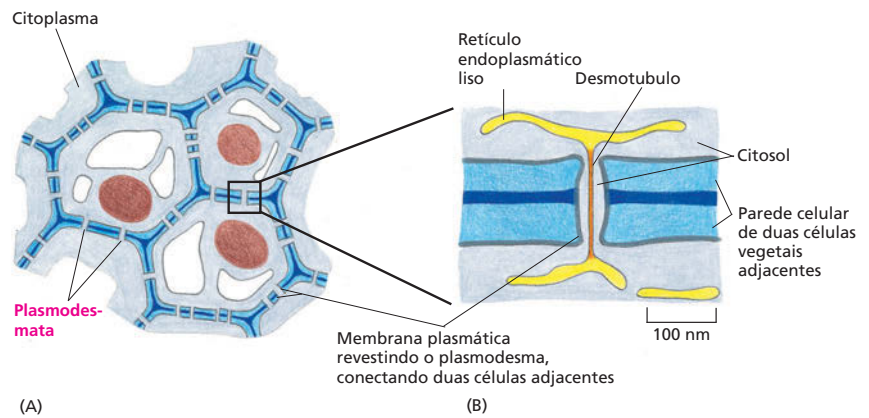
As junções tipo fenda são estruturas dinâmicas que, como os canais iônicos convencionais, são controlados: elas podem se fechar por uma mudança conformacional reversível em resposta às alterações celulares. A permeabilidade das junções tipo fenda é reduzida em segundos, por exemplo, quando o Ca^{2+} intracelular aumenta. Discuta por que essa forma de regulação pode ser importante para manter um tecido saudável.

MANUTENÇÃO E RENOVAÇÃO DOS TECIDOS

Não podemos estudar a organização dos tecidos sem nos preocuparmos como essas estruturas e padrões surpreendentes são formados. Isso suscita novamente a questão mais antiga e fundamental da biologia. Como um organismo multicelular é produzido a partir de um único ovo fertilizado?

No processo de desenvolvimento, a célula-ovo se divide repetidamente, dando origem a um clone, com cerca de 10.000.000.000.000 células para um ser humano, todas contendo o mesmo genoma, mas especializadas em diferentes maneiras. Esse clone possui uma estrutura. Ele pode tomar a forma de uma margarida ou um carvalho, um ouriço-do-mar, uma baleia ou um camundongo (**Figura 20-32**). A estrutura é determinada pelo genoma contido no ovo. A sequência linear de nucleotídeos A, G, C e T do DNA comanda a produção dos distintos

Figura 20-30 **Sinais extracelulares podem regular a associação de duas junções tipo fenda.** (A) Neurônio da retina de coelho injetado com o corante Lúcifer amarelo, o qual passa facilmente pela junção tipo fenda. Assim, o corante marca os neurônios do mesmo tipo que estão conectados pela junção tipo fenda. (B) A retina foi tratada com o neurotransmissor dopamina e então injetada com Lúcifer amarelo. Como pode ser visto, o tratamento com dopamina diminui grandemente a permeabilidade das junções tipo fenda. (Cortesia de David Vaney.)

Figura 20-31 As células vegetais estão conectadas através de plasmodesmata. (A) Os canais citoplasmáticos dos plasmodesmata perfuram a parede celular das células vegetais conectando todas as células da planta. (B) Cada plasmodesma está alinhado com a membrana plasmática comum às duas células conectadas. O plasmodesmata normalmente contém uma fina estrutura tubular, o desmotúbulo, derivado do retículo endoplasmático liso.

tipos celulares do hospedeiro, cada um expressando diferentes grupos de genes e arranjados em um padrão preciso, intrincado e tridimensional.

Embora a estrutura final do corpo de um animal possa ser extremamente complexa, ele é produzido por um repertório limitado de atividades celulares. Um exemplo de todas essas atividades foi discutido nas primeiras páginas deste livro. As células crescem, dividem-se e morrem. Elas formam ligações mecânicas e geram forças para o movimento. Elas se diferenciam ativando e desativando a produção de uma série específica de proteínas. Elas produzem sinais moleculares que influenciam as células vizinhas e respondem aos sinais moleculares que as células vizinhas enviam para elas. Elas lembram os efeitos de sinais que receberam previamente e se tornam de forma progressiva mais e mais especializadas nas características que elas adotaram. O genoma, idêntico em cada célula, define as regras de acordo com as várias atividades celulares possíveis necessárias. Por meio desse processo em cada célula individualmente, o genoma coordena todo o processo intrincado pelo qual um organismo multicelular é gerado a partir de

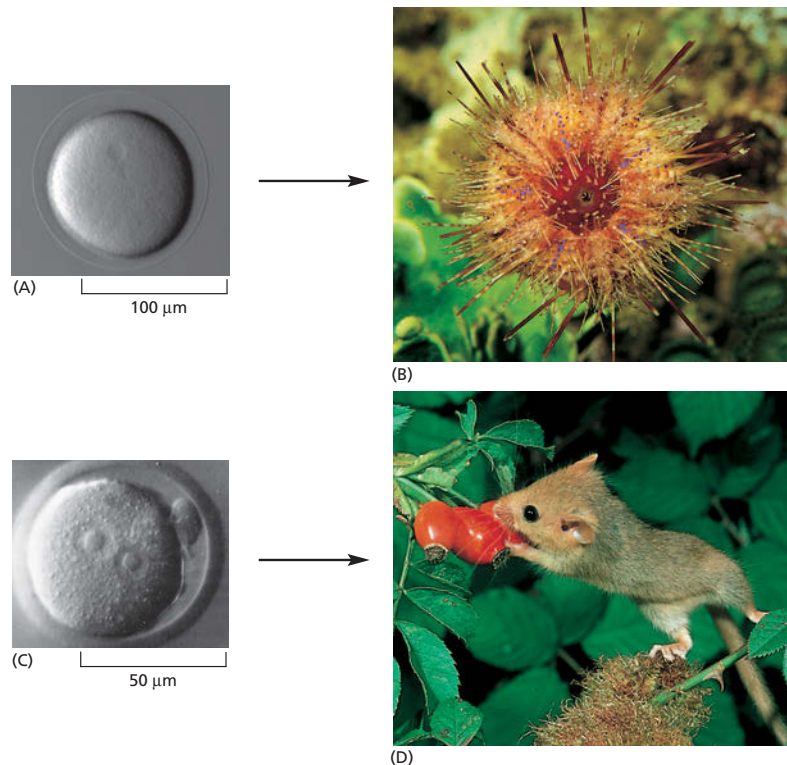



Figura 20-32 O genoma do ovo determina a estrutura do clone de células que ele irá originar. (A e B) Um ovo de ouriço-do-mar que dá origem a um ouriço-do-mar; (C e D) um ovo de camundongo que dá origem a um camundongo. (A, cortesia de David McClay; B, cortesia de M. Gibbs, com permissão de Oxford Scientific Films; C, cortesia de Patricia Calarco, de G. Martin, *Science* 209:768-776, 1980, com permissão de AAAS; D, cortesia de O. Newman, com permissão de Oxford Scientific Films.)

um ovo fertilizado. As **Animações 1.1**, **20.3** e **20.4** são exemplos de como se inicia o desenvolvimento dos embriões de um sapo, uma mosca-das-frutas e um peixe-zebra.

Para os biólogos do desenvolvimento, o desafio é explicar, nesses termos, a sequência completa de eventos conectados que vão desde o ovo até o organismo adulto. Não tentaremos responder a essas questões aqui, pois não há espaço para que se faça justiça, mesmo que uma grande parte desse processo já seja conhecida. No entanto, as mesmas atividades básicas que se combinam para criar o organismo durante o desenvolvimento continuam também no organismo adulto, onde novas células são produzidas de modo contínuo com padrões precisamente controlados. É esse tópico mais limitado que discutiremos nesta seção, focalizando a organização e a manutenção dos tecidos dos vertebrados.

Os tecidos são misturas organizadas de muitos tipos celulares

Embora os tecidos especializados em nosso organismo difiram em muitas maneiras, eles apresentam algumas necessidades básicas, em geral fornecidas por uma mistura de tipos celulares, como ilustrado para a pele na **Figura 20-33**. Como discutido, todos os tecidos necessitam de força mecânica, que frequentemente é proporcionada por um suporte ou uma rede de tecido conectivo povoado por fibroblastos. Nesse tecido conectivo, os vasos sanguíneos são revestidos por células endoteliais que satisfazem as necessidades de oxigênio, de nutrientes e de eliminação de resíduos. Igualmente, a maioria dos tecidos é enervada por axônios das células nervosas, as quais são recobertas pelas células de Schwann, que conferem um isolamento elétrico. Os macrófagos eliminam as células mortas e outros resíduos indesejáveis, e os linfócitos e outras células sanguíneas combatem a infecção. A maioria desses tipos celulares se origina fora do tecido, invadindo-os no início do desenvolvimento (células endoteliais, axônios de células nervosas e células de Schwann) ou continuamente durante a vida do orga-

Figura 20-33 **A pele dos mamíferos é constituída por vários tipos celulares.** (A) Diagrama esquemático mostrando a arquitetura celular da pele grossa. (B) Fotografia de um corte fino da planta de um pé humano corado com hematoxilina e eosina. A pele é um grande órgão composto por dois tecidos principais: o tecido epitelial (*a epiderme*), o qual se localiza mais externamente, e o tecido conectivo, o qual consiste em uma *derme* resistente (do qual é feito o couro), e a camada subjacente adiposa, a *hipoderme*. Cada tecido é composto por uma variedade de tipos celulares. A derme e a hipoderme são ricamente supridas por vasos sanguíneos e nervos. Algumas fibras nervosas se estendem também para a epiderme.

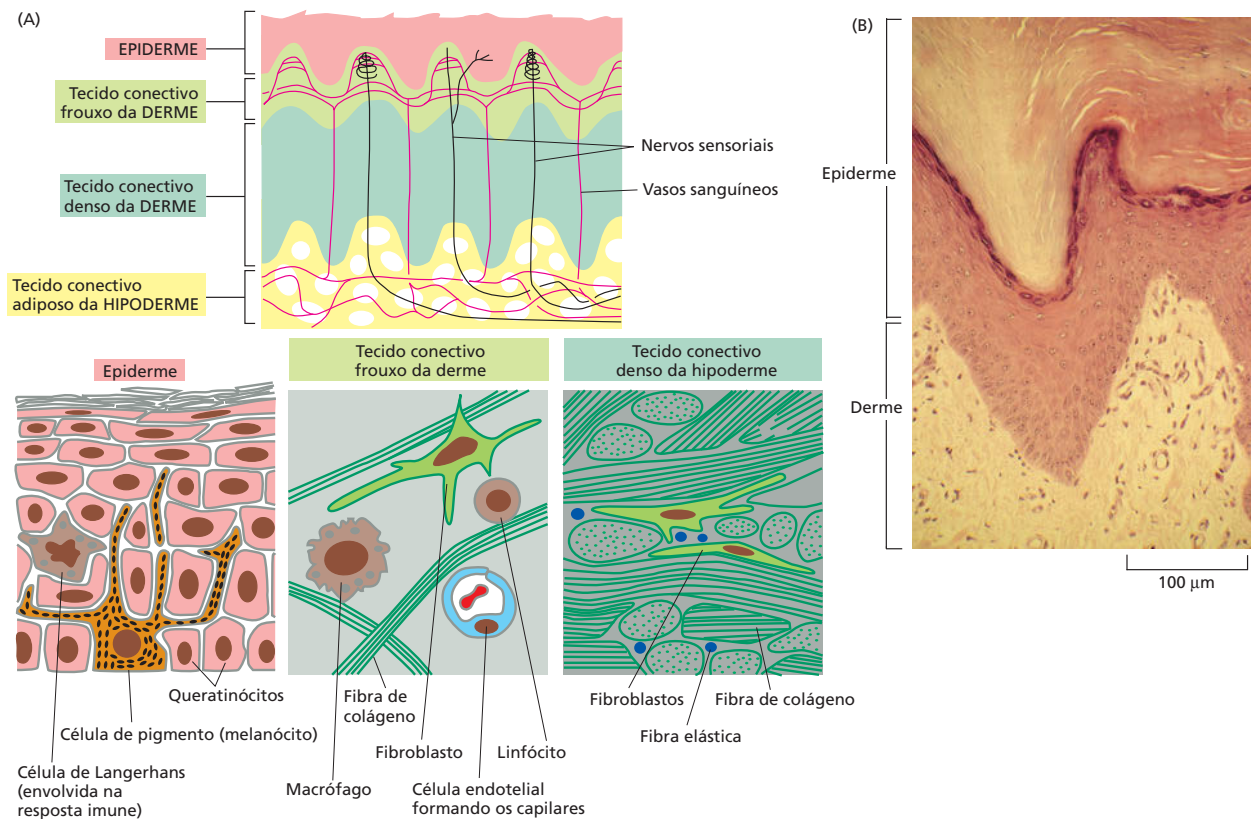
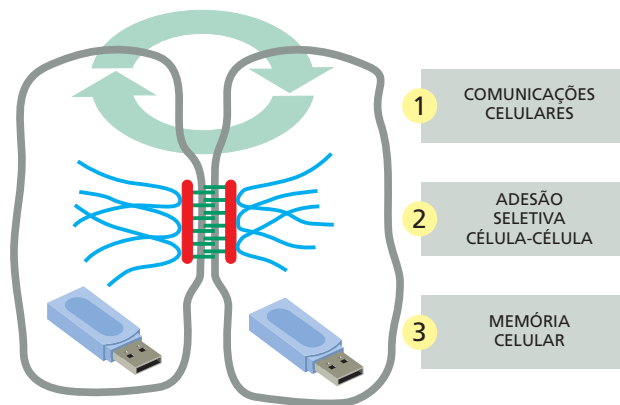



Figura 20-34 Três fatores-chave que mantêm a organização celular dos tecidos.

nismo (macrófagos e outros leucócitos). Esse complexo aparato de sustentação é necessário para manter as principais células especializadas dos tecidos, por exemplo, as células contráteis do músculo, as células secretoras das glândulas ou as células formadoras do tecido sanguíneo da medula óssea.

Quase todos os tecidos são, portanto, uma mistura intrincada de muitos tipos celulares que devem permanecer diferentes uns dos outros enquanto coexistem em um mesmo ambiente. Além disso, em quase todo o tecido adulto, as células estão morrendo continuamente e sendo substituídas. Apesar dessa confusão de substituição celular e renovação dos tecidos, a organização dos tecidos deve ser preservada. Três principais fatores contribuem para tornar possível essa estabilidade estrutural (**Figura 20-34**).

1. Comunicações celulares: cada tipo de célula especializada monitora continuamente seu ambiente para sinais recebidos de outras células e ajusta seu comportamento de acordo. De fato, a sobrevivência da maioria das células depende de tais sinais sociais (discutidos no Capítulo 16). Essas comunicações asseguram que as novas células sejam produzidas e sobrevivam somente quando e onde forem necessárias.
2. Adesão seletiva célula-célula: como os diferentes tipos de células possuem diferentes caderinas e outras moléculas de adesão na sua membrana plasmática, elas tendem a se manter unidas seletivamente a outras células do mesmo tipo por ligações homofílicas. Elas podem também formar ligações seletivas a determinados tipos celulares ou a componentes da matriz extracelular específicos. A seletividade de adesão impede que diferentes tipos celulares sejam caoticamente misturados em um tecido.
3. Células de memória: como vimos no Capítulo 8, padrões especializados de expressão gênica, despertados por sinais que atuaram durante o desenvolvimento embrionário, são estavelmente mantidos, de modo que as células preservam de forma autônoma suas características distintas e passam as mesmas para sua progênie. Os fibroblastos se dividem para produzir mais fibroblastos, as células endoteliais se dividem para produzir mais células endoteliais e assim por diante. Esse princípio, com elaborações que explicaremos mais adiante, preserva a diversidade dos tipos celulares de um tecido.

Diferentes tecidos são renovados em diferentes velocidades

As taxas e os padrões de renovação e substituição das células nos tecidos variam enormemente. Em um extremo, estão as células nervosas, a maioria das quais passam toda a vida sem substituição. No outro extremo, estão as células que revestem o intestino, as quais são substituídas em poucos dias. Entre esses extremos, há um espectro de diferentes taxas e estilos de substituição celular e renovação dos tecidos. O osso, por exemplo, possui um período de reposição de

cerca de dez dias no homem, envolvendo a renovação da matriz e das células. A matriz óssea velha é lentamente eliminada por uma serie de células denominadas *osteoclastos*, semelhantes aos macrófagos, e a nova matriz é depositada por outro tipo celular, os *osteoblastos*, semelhantes aos fibroblastos. No homem, novas hemácias são produzidas continuamente na medula óssea (a partir de outra classe de células) e liberadas na circulação, de onde são removidas e destruídas a cada 120 dias. Na pele, a camada externa da epiderme é continuamente descamada e substituída pelas células das camadas mais internas, de modo que a epiderme é renovada a cada dois meses. E assim por diante.

Nossa vida depende desses processos de renovação. Uma grande dose de radiação ionizante bloqueia a divisão celular e impede a renovação. Dentro de poucos dias, o revestimento do intestino, por exemplo, torna-se destituído de células, levando a uma diarreia devastadora e à perda de água característica da doença de radiação aguda.

Claramente, deve haver mecanismos de controle para manter um balanço entre produção e perda celular normal do organismo adulto. O câncer se origina da violação desses controles, permitindo que as células dos tecidos de autorrenovação proliferem excessivamente. Portanto, para entender o câncer, é importante entender os processos normais de renovação dos tecidos corrompidos pelo câncer.

As células-tronco fornecem um suprimento contínuo de células terminalmente diferenciadas

Muitas das células diferenciadas que necessitam de uma substituição contínua são incapazes de se dividirem por si mesmas. As hemácias, as células da superfície da epiderme, as células de absorção e as células caliciformes que revestem o intestino são exemplos desse tipo de células. Tais células são referidas como *terminalmente diferenciadas*: elas se encontram no final de seu desenvolvimento.

Substituições para essas células terminalmente diferenciadas são produzidas de estoques de *células precursoras em proliferação*, as quais normalmente derivam de um pequeno número de **células-tronco** em divisão. As células-tronco e as células precursoras em proliferação são retidas nos tecidos correspondentes juntamente com as células diferenciadas. As células-tronco não são terminalmente diferenciadas e podem dividir-se sem limites (ou pelo menos pelo tempo de vida do organismo). Quando a célula-tronco se divide, cada célula-filha tem uma escolha, ou elas permanecem como células-tronco, ou se encaminham para uma via irreversível que leva à diferenciação terminal, normalmente por meio de uma série de divisões de células precursoras (**Figura 20-35**). A função das células-tronco e das células precursoras não é a de desempenhar as funções especializadas das células diferenciadas, mas sim de produzir as células que irão realizar essas funções. As células-tronco em geral estão em pequeno número e frequentemente possuem uma aparência indefinível, tornando-as difícil de serem identificadas. Embora não sejam terminalmente diferenciadas, as células-tronco dos tecidos adultos são, contudo, especializadas. Sob condições normais, elas expressam estavelmente uma série de reguladores de transcrição que asseguram que sua progênie diferenciada seja do tipo adequado.

O padrão de substituição celular varia de acordo com o tecido no qual se encontra a célula-tronco. No revestimento do intestino delgado, por exemplo, as células de absorção e as células secretoras (células caliciformes produtoras de muco, assim como alguns outros tipos de células secretoras) estão arranjadas como um epitélio de camada simples que reveste a superfície das estruturas semelhantes a dedos, as vilosidades que se projetam no lúmen do intestino. Esse epitélio é contínuo com o epitélio que reveste as criptas que invaginam até o tecido conectivo subjacente, e as células-tronco se localizam próximas à base das criptas. Células caliciformes e células de absorção recém-derivadas das células-tronco começam sua diferenciação nas criptas. A maioria dessas células em

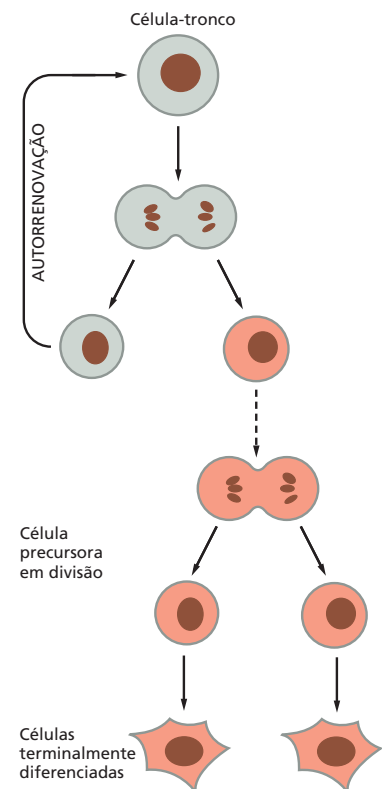



Figura 20-35 Quando uma célula-tronco se divide, cada célula-filha pode manter-se como célula-tronco ou prosseguir e tornar-se terminalmente diferenciada. As células terminalmente diferenciadas em geral se desenvolvem de células precursoras que se dividem um número limitado de vezes antes de diferenciar.

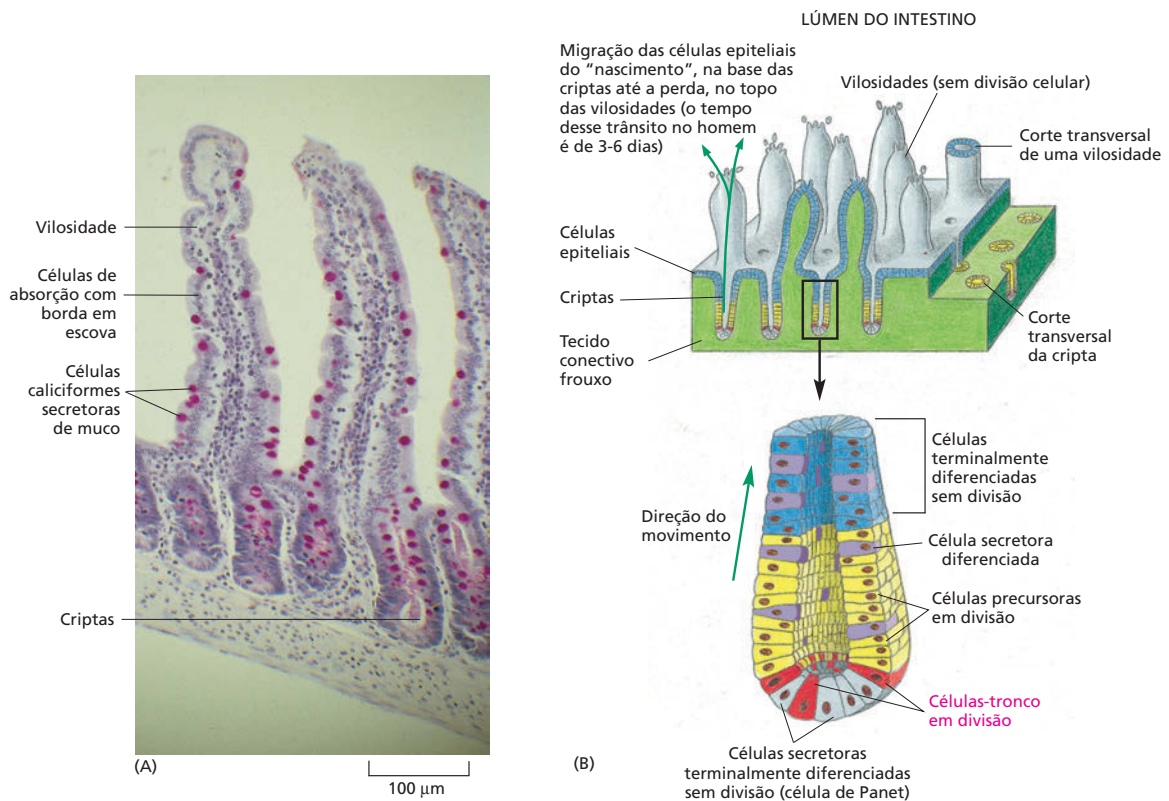



Figura 20-36 A renovação ocorre continuamente no revestimento do intestino adulto. (A) Fotografia de uma secção de parte do revestimento do intestino delgado mostrando as vilosidades e as criptas. Observe como as células caliciformes secretoras de muco (coradas em *roxo*) estão entremeadas entre as células de absorção com borda em escova do epitélio da vilosidade. Um pequeno número de outros dois tipos celulares, as células endócrinas (não mostrado), as quais secretam os hormônios intestinais e as células de Panet, que secretam proteínas bactericidas, também estão presentes e derivam das mesmas células-tronco. (B) Desenho mostrando o padrão de renovação celular e a proliferação das células-tronco do epitélio que forma o revestimento do intestino delgado dos mamíferos. Todos os tipos celulares diferenciados possuem um tempo de vida finito, finalizado pela morte celular programada, e estão sendo constantemente substituídas pela progênie das células-tronco. Acredita-se que a organização das vilosidades e criptas seja mantida por sinais do ambiente das criptas que mantêm as células das criptas em proliferação, como será explicado mais adiante.

diferenciação são movidas até as porções superiores das vilosidades no plano da camada epitelial até atingirem as superfícies expostas das vilosidades. Nas extremidades das vilosidades, elas morrem e são descamadas para o lúmen do intestino (Figura 20-36).

Um exemplo contrastante é encontrado na epiderme. A epiderme é um epitélio estratificado com células-tronco e células precursoras localizadas na camada basal, aderidas à lâmina basal. As células em diferenciação se movimentam do seu local de origem em direção perpendicular ao plano da camada de células (Figura 20-37).

Frequentemente, um único tipo de célula-tronco dá origem a diversos tipos de progênie diferenciada. As células-tronco do intestino, por exemplo, produzem células de absorção, células caliciformes e outros tipos de células secretoras. O processo de formação das células sanguíneas, ou hematopoiese, fornece um exemplo extremo desse fenômeno. Todos os diferentes tipos de células sanguíneas – tanto as hemácias que transportam o oxigênio quanto outros tipos de leucócitos que combatem infecções (Figura 20-38) – derivam de uma célula-tronco hematopoiética comum encontrada na medula óssea (Figura 20-39).

QUESTÃO 20-7

Por que você acha que as células epiteliais que revestem o intestino são renovadas frequentemente, ao passo que a maioria dos neurônios dura por toda a vida do organismo?

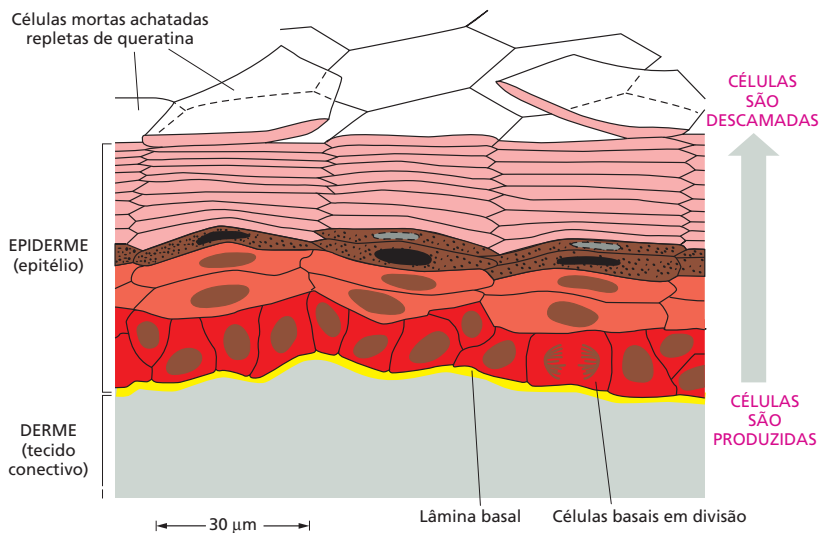



Figura 20-37 A epiderme é renovada a partir das células-tronco de sua lâmina basal. A camada basal contém uma mistura de células-tronco e células precursoras em divisão que são produzidas a partir das células-tronco. Após emergirem da camada basal, elas param de dividir e se movem para fora à medida que se diferenciam. Eventualmente, as células sofrem uma forma especial de morte celular: o núcleo se desintegra, e a célula encolhe formando uma escama achatada repleta de queratina. A escama é finalmente descartada da superfície do corpo.

Sinais específicos mantêm a população de células-tronco

Todos os sistemas de células-tronco requerem mecanismos de controle para assegurar que novas células sejam produzidas nos locais corretos e em quantidades adequadas. Os controles dependem dos sinais moleculares compartilhados entre as células-tronco, sua progênie e os tecidos circundantes. Esses sinais e as vias bioquímicas por meio das quais elas atuam são classificados, surpreendentemente, em um pequeno grupo de famílias, correspondendo a uma meia dúzia de mecanismos básicos de sinalização, alguns já discutidos no Capítulo 16. Esses poucos mecanismos são usados e reusados, no embrião e no adulto, em diferentes combinações e ativam diferentes respostas em contextos distintos.

Quase todas essas famílias de mecanismos de sinalização contribuem para o desafio de manter a organização complexa de um sistema de células-tronco como o do intestino. Assim, uma classe de moléculas conhecidas como **proteínas Wnt** mantém as células-tronco e as células precursoras da base de cada cripta intestinal em um estado proliferativo. As células nessas regiões secretam

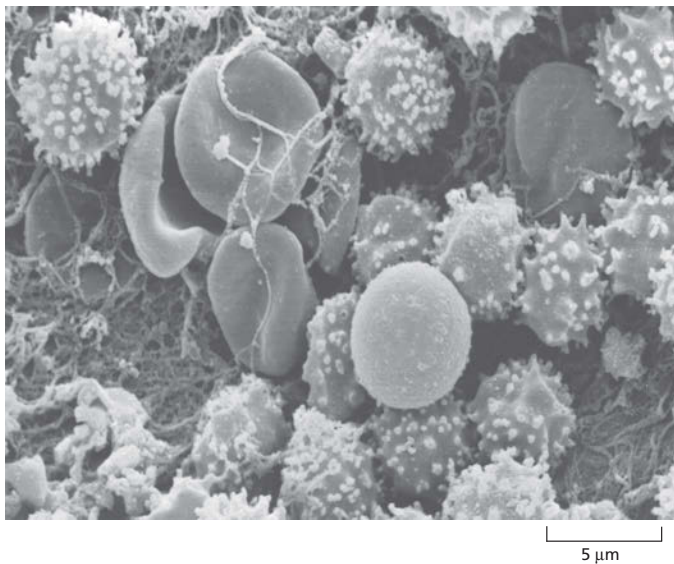
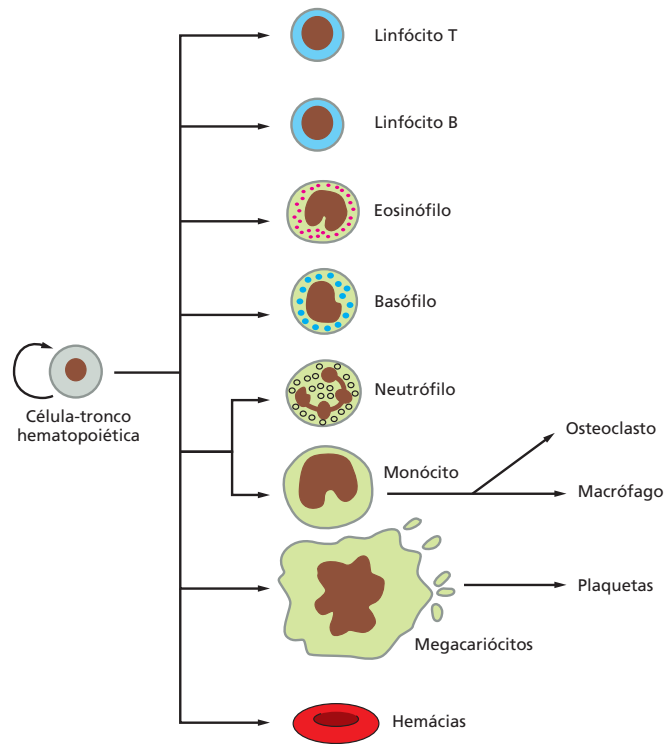



Figura 20-38 O sangue contém vários tipos celulares circulantes, todos derivados de um único tipo de célula-tronco. Nessa micrografia eletrônica de varredura, células esféricas maiores com superfície rugosa são os neutrófilos. As células menores, mais lisas e achatadas são as hemácias. (De R.G. Kessel e R.H. Kardon, Tissues and Organs: A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy. São Francisco: Freeman 1979. Com permissão de W.H. Freeman and Company.)

Figura 20-39 A célula-tronco hematopoiética divide para dar origem a mais células-tronco e células precursoras (não mostrado) que proliferam e diferenciam em tipos de células sanguíneas maduras encontradas na circulação. Os macrófagos encontrados em muitos tecidos do organismo e os osteoclastos que degradam a matriz óssea se originam da mesma fonte, assim como outros poucos tipos de células de tecidos não apresentados neste desenho. Os megacariócitos dão origem às plaquetas (**Animação 20.5**). Um grande número de diferentes moléculas sinalizadoras atuam em vários pontos nessa linhagem celular, para controlar a produção de cada tipo celular e manter o número adequado de células-tronco.

proteínas Wnt, expressam receptores para essas proteínas e, aparentemente, por meio de um sistema de retroalimentação positivo, estimulam a si mesmas para uma contínua divisão (**Figura 20-40**). Ao mesmo tempo, essas células produzem outros sinais, que atuam a longa distância para impedir a ativação da via Wnt fora das criptas. Essas células das criptas trocam sinais umas com as outras para controlar sua diversificação, de modo que algumas células se diferenciam em células secretoras, e outras se tornam células de absorção.

Alterações desses mecanismos de sinalização perturbam a estrutura do revestimento do intestino. Em particular, como veremos mais adiante, defeitos na regulação da sinalização Wnt estão relacionados com as formas mais comuns de câncer intestinal humano.

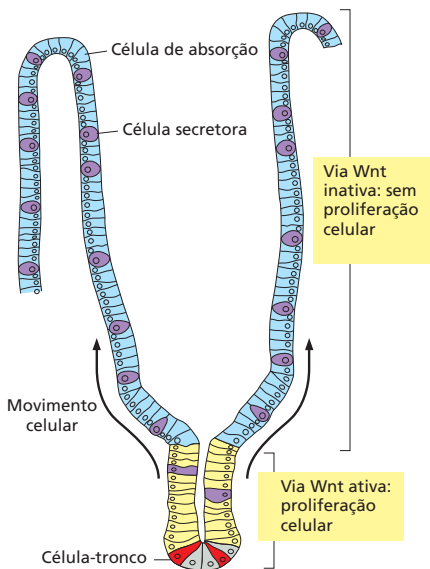



Figura 20-40 No intestino, a via de sinalização Wnt auxilia no controle da produção de células diferenciadas a partir das células-tronco. A sinalização da via Wnt mantém a proliferação nas criptas, onde estão localizadas as células-tronco, e sua progênie se torna comprometida com diversos destinos.

As células-tronco podem ser usadas para reparar os tecidos danificados

As células-tronco podem proliferar indefinidamente e produzir uma progênie diferenciada; assim, elas permitem a contínua renovação do tecido normal, bem como o reparo do tecido perdido durante um ferimento. Por exemplo, transfundindo algumas células-tronco hematopoiéticas em um camundongo cujas próprias células-tronco foram destruídas por irradiação, é possível repopular completamente o animal com novas células sanguíneas e recuperá-lo da morte por anemia, infecção ou ambas. Uma estratégia similar é usada no tratamento da leucemia humana com irradiação (ou fármacos citotóxicos), seguido de transfusão de células de medula óssea.

As células-tronco, retiradas diretamente dos tecidos adultos, sustentam a promessa do reparo de tecidos, mas outro tipo de células-tronco apresenta um potencial ainda maior. É possível, por meio da cultura de células, obter de embriões precoces de camundongos uma classe extraordinária de células-tronco, denominada **células-tronco embrionárias**, ou **células ES** (de *embryonic stem cells*). Sob condições apropriadas, essas células podem proliferar indefinidamente em cultura e ainda manter o potencial de desenvolvimento irrestrito e, portan-

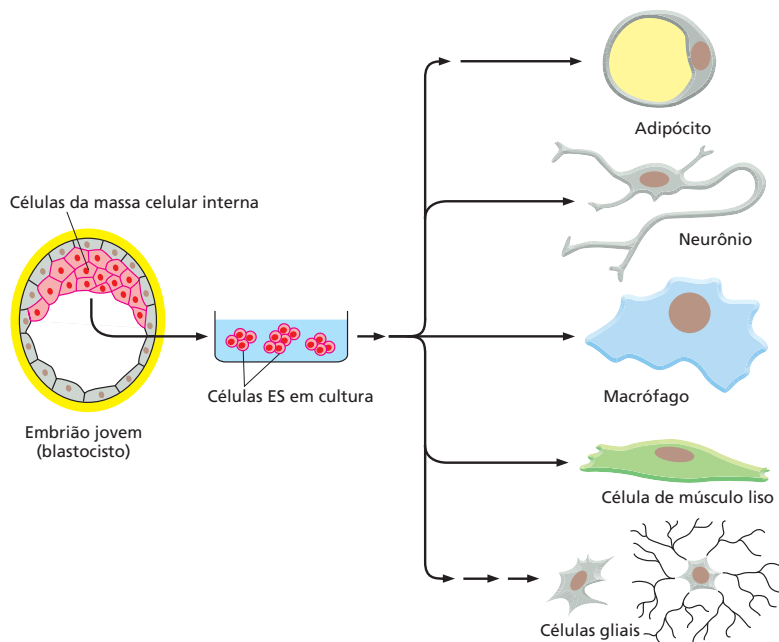



Figura 20-41 As células ES derivadas de embrião podem dar origem a todos tipos de células e tecidos do organismo. As células ES são obtidas da massa celular interna de um embrião precoce e podem ser mantidas indefinidamente como células-tronco em cultura. Se elas forem colocadas de novo no embrião, elas irão se integrar perfeitamente e diferenciar conforme o ambiente onde se encontram. As células também podem ser mantidas em cultura e supridas com hormônios e fatores de crescimento para encorajar sua diferenciação em tipos celulares específicos (**Animação 20.6**). (Com base em dados de E. Fuchs e J.A. Segré, *Cell* 100:143-155, 2000. Com permissão de Elsevier.)

to, são ditas *pluripotentes*. Se essas células das placas de cultura são novamente colocadas no ambiente embrionário, elas podem dar origem a todos os tipos de tecidos e células do organismo, incluindo as células germinativas (**Figura 20-41**). Suas descendentes no embrião serão capazes de se integrar perfeitamente em qualquer local que venham a ocupar, adotando o comportamento e as características que as células normais teriam nesse ambiente.

Células com propriedades similares àquelas células ES de camundongos podem ser obtidas de embriões humanos precoces, criando um suprimento potencialmente inesgotável de células que podem ser usadas para substituir e reparar o tecido humano maduro danificado. Experimentos com camundongos sugerem que será possível, em um futuro próximo, usar células ES para substituir fibras do músculo esquelético que degeneraram nas vítimas de distrofia muscular, células nervosas degeneradas de pacientes com doença de Parkinson, células secretoras de insulina que são destruídas no diabete tipo I e células do músculo estriado cardíaco que morreram durante um ataque do coração. Talvez, um dia, possa ser possível crescer órgãos inteiros a partir das células ES mimetizando o ambiente embrionário.

Entretanto, há problemas importantes associados ao uso das células-tronco associadas ao reparo dos tecidos. Se as células transplantadas são geneticamente diferentes daquelas do paciente no qual elas serão enxertadas, elas serão rejeitadas e destruídas pelo sistema imune. Uma solução possível para esse problema é o emprego de uma estratégia conhecida coloquialmente como "clonagem terapêutica", que será explicada a seguir.

A clonagem terapêutica poderá proporcionar uma maneira de produzir células ES personalizadas

O termo "clonagem" tem sido empregado de forma confusa como um termo abreviado para procedimentos distintos, principalmente em debates públicos a respeito dos aspectos éticos da pesquisa com células-tronco. Assim, é importante entender as distinções.

Os biólogos definem o termo clone como um grupo de indivíduos que são geneticamente idênticos, pois descendem de um único ancestral. O tipo mais simples de clonagem é a clonagem celular. Assim, pode-se pegar uma única célula-tronco epidérmica da pele e deixá-la crescer e dividir em cultura para ob-

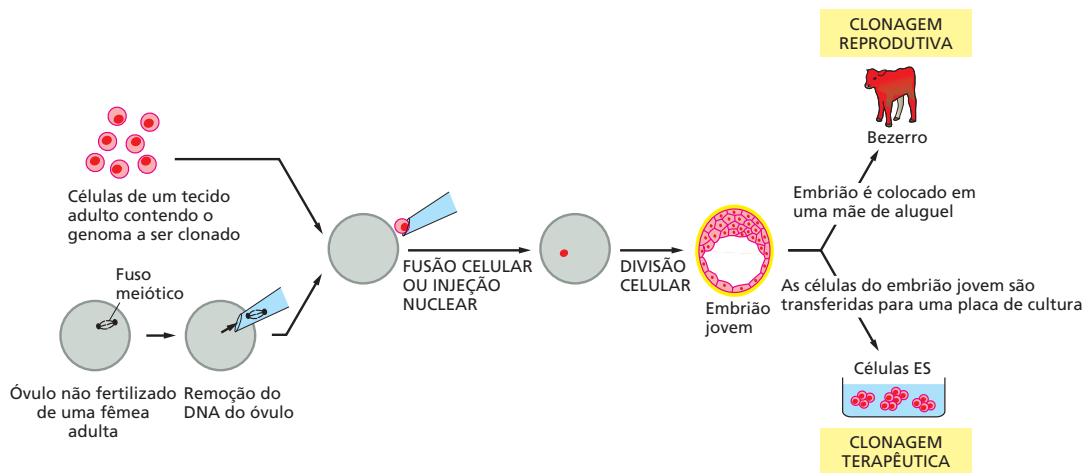



Figura 20-42 As células do tecido adulto podem ser usadas para "clonagem" em dois sentidos completamente diferentes. Na clonagem reprodutiva, é produzido um novo indivíduo multicelular, e, na clonagem terapêutica, somente células são produzidas. Na estratégia apresentada aqui, os dois procedimentos iniciam com o transplante nuclear: o núcleo obtido de uma célula adulta é transferido para o citoplasma de um ovo para criar uma célula que possui um caráter embrionário, mas possui genes de uma célula adulta.

ter um grande clone de células epidérmicas geneticamente idênticas, as quais, por exemplo, podem ser usadas para reconstruir a pele de pacientes queimados. Esse tipo de clonagem não é nada mais do que uma extensão artificial do processo de proliferação e reparo que ocorre normalmente no organismo.

A clonagem de animais multicelulares completos, denominada **clonagem reprodutiva**, é uma estratégia muito diferente, envolvendo uma situação muito mais radical do que o simples curso da natureza. Como vimos no Capítulo 19, cada indivíduo animal possui uma mãe e um pai, e nenhum deles é geneticamente idêntico. Na clonagem reprodutiva, a necessidade dos dois pais foi descartada. Em mamíferos, essas dificuldades já foram superadas com camundongos, ovelhas e outros animais domésticos pela *transferência nuclear*. O procedimento inicia com um óvulo não fertilizado. O núcleo dessas células de gameta haploide é retirado, e em seu lugar é colocado o núcleo de uma célula diploide normal. A célula diploide doadora pode ser retirada de qualquer tecido de um indivíduo adulto. A célula híbrida que consiste em um núcleo doador diploide no citoplasma do ovo hospedeiro é mantida em cultura por um curto período. Em alguns poucos casos, pode dar origem a um embrião precoce, o qual é então colocado no útero de uma mãe de aluguel (**Figura 20-42**). Se o pesquisador tiver sorte, o desenvolvimento continua como o de um embrião normal, finalmente dando origem a um novo animal. Um indivíduo produzido dessa forma, por clonagem reprodutiva, deve ser geneticamente idêntico ao individuo adulto que doou a célula diploide (exceto por uma pequena quantidade de material genético contido na mitocôndria localizada no citoplasma do ovo).

Outro procedimento, novamente diferente desses já descritos, emprega a técnica do transplante nuclear para produzir células ES (ver Figura 20-42). Nesse caso, a célula que recebeu o núcleo transplantado passa pelos estágios iniciais do desenvolvimento, dando origem a um embrião muito precoce, consistindo em cerca de 200 células. No entanto, esse embrião não é transferido para o útero de uma mãe de aluguel. Em vez disso, ele é usado como fonte de células ES em cultura, com o objetivo de produzir vários tipos celulares que podem ser usados para o reparo de tecidos. Esta denominada **clonagem terapêutica** é uma técnica elaborada para a produção de células ES personalizadas, em vez de um animal clonado completo. Como essas células obtidas por esse procedimento são geneticamente idênticas às células do doador original, elas podem ser recolocadas no indivíduo adulto de onde as células doadoras foram retiradas sem o risco de rejeição. O transplante nuclear é tecnicamente muito difícil e ainda não foi bem sucedido com células de ovo humanas. O procedimento requer um suprimento de óvulos humanos, os quais podem ser obtidos de mulheres doadoras, mas origina sérios problemas éticos. Além disso, o transplante nuclear em óvulos humanos é proibido em alguns países.

Figura 20-43 Células-tronco pluripotentes induzidas (células iPS) podem ser geradas por meio da transformação direta de células de tecido adulto. Esse procedimento é iniciado pela obtenção de células de um tecido adulto, nesse exemplo, um fibroblasto obtido de uma biópsia, e colocadas em cultura. Usando vírus manipulados geneticamente como vetores, os pesquisadores introduzem artificialmente, nessas células, um grupo específico de genes que codificam para reguladores de transcrição que, normalmente, são expressos nas células ES. Essas construções gênicas são expressas nos fibroblastos hospedeiros, coordenando a produção das proteínas correspondentes. Após algumas semanas em cultura, alguns desses fibroblastos se transformam em células que se assemelham e se comportam como células ES e possuem a mesma capacidade das células ES de se diferenciarem em qualquer tipo de célula do organismo.

Esses problemas éticos podem ser resolvidos por uma estratégia alternativa mais recente na qual as células são obtidas de tecidos adultos, cultivadas e reprogramadas para um estado semelhante ao de um embrião humano, por meio da introdução artificial de uma série específica de genes, usando vírus manipulados como vetores. Os investigadores observaram que um grupo de apenas três genes (denominados *Oct3/4*, *Sox2* e *Klf4*) é suficiente para converter fibroblastos em células com praticamente todas as propriedades das células ES, incluindo a capacidade de diferenciar em diversas maneiras e contribuir para qualquer tecido (Figura 20-43). Essas células semelhantes a ES são denominadas **células--tronco pluripotentes induzidas** (**células iPS**, de *induced pluripotent stem cells*). A taxa de conversão é baixa; entretanto, somente uma pequena proporção dos fibroblastos realiza essa mudança, e há várias preocupações a respeito da segurança da implantação dessas células derivadas de células infectadas por vírus em pacientes. Muito ainda deve ser feito antes que essa estratégia possa ser aplicada em doenças humanas.

Enquanto isso, células ES humanas e, em especial, células iPS humanas prometem ser imediatamente valiosas de outras maneiras. Elas podem ser usadas para produzir grandes populações homogêneas de células diferenciadas em um tipo específico em cultura, as quais podem servir para testar os efeitos de inúmeros compostos químicos na busca de novas medicações com ações úteis em determinados tipos de células humanas. Além disso, é possível criar células iPS contendo o genoma de pacientes que sofrem de determinadas doenças genéticas e usar essas células-tronco específicas dos pacientes para a procura de medicamentos úteis no tratamento da sua doença. Tais células serão valiosas também para a análise dos mecanismos das doenças. Basicamente, a manipulação das células ES e iPS em cultura podem auxiliar no conhecimento aprofundado de muitos mistérios ainda não resolvidos a respeito da biologia das células-tronco.

CÂNCER

Pagamos um preço por termos um organismo que pode renovar e reparar a si mesmo. Os delicados mecanismos de ajuste que controlam esses processos podem falhar, levando ao rompimento catastrófico das estruturas do corpo. À frente de todas as doenças de renovação de tecidos, está o **câncer**, o qual, juntamente com doenças infecciosas, má nutrição, guerra e doenças cardíacas, é a principal causa de morte na população humana. Na Europa e na América do Norte, por exemplo, uma em cada quatro pessoas irá morrer de câncer.

O câncer surge da violação das regras básicas do comportamento celular social. Para que se possa entender a origem e o progresso dessa doença, e para desenvolver tratamentos, temos de revisar todos os nossos conhecimentos de como as células atuam e interagem nos tecidos. Reciprocamente, muito do que sabemos sobre as células e sobre a biologia dos tecidos foi descoberto como consequência do resultado da pesquisa do câncer. Nesta seção, veremos as causas e os mecanismos do câncer, o tipo de comportamento celular anormal que contribui para essa doença e o que podemos esperar do uso de nosso entendimento para evitar esse mau funcionamento das células e evitar que causem a morte.

As células cancerosas proliferam, invadem e metastatizam

Se a ordem como os tecidos do organismo crescem e renovam deve ser mantida, cada célula deve ajustar seu comportamento de acordo com as necessidades do organismo como um todo. As células devem dividir quando novas células de seu tipo específico são necessárias e evitar a divisão quando não são. Elas devem sobreviver por todo o período que são necessárias e se suicidarem quando requeridas. Elas devem manter características especializadas apropriadas, devem ocupar os locais adequados e não invadir locais inadequados.

É óbvio que em um grande organismo, nenhum dano significante ocorre quando uma única célula apresenta, às vezes, um mau comportamento. Contudo, um colapso potencialmente devastador do controle pode ocorrer quando uma única célula sofre uma alteração genética que permite que ela sobreviva e divida quando não deveria, produzindo células-filhas que se comportam da mesma forma antissocial. A organização dos tecidos, e eventualmente a do organismo como um todo, pode ser rompida por um impiedoso clone de células anormais em expansão. É essa catástrofe que ocorre no câncer.

As células cancerosas são definidas por duas propriedades hereditárias: elas e sua progênie (1) proliferam desafiando as restrições normais e (2) invadem e colonizam territórios reservados para outras células (**Animação 20.7**). É a combinação dessas características que cria um perigo letal. Células que apresentam a primeira propriedade, e não a segunda, proliferando excessivamente, mas que se mantêm unidas em uma única massa, formam um tumor, mas o tumor neste caso é dito *benigno* e, normalmente, pode ser removido completamente por cirurgia. Um tumor só é canceroso quando suas células têm a capacidade de invadir os tecidos vizinhos, e nesse caso é dito *maligno*. Células tumorais malignas com essas propriedades invasivas podem desprender-se do tumor primário, entrar na circulação sanguínea ou nos vasos linfáticos e formar tumores secundários (*metástases)*, em outros locais do organismo (**Figura 20-44**). Quanto mais o tumor se espalha, mais difícil será para erradicá-lo.

A epidemiologia identifica causas evitáveis de câncer

A prevenção é sempre melhor do que a cura, mas para prevenir o câncer, precisamos conhecer suas causas. Fatores do ambiente ou nossas características de vida ativam a doença e fazem com que ela prossiga? Se sim, quais são elas? As respostas a essas questões são obtidas principalmente de estudos epidemiológicos, e os dados da análise estatística das populações humanas são usados para identificar os fatores que se correlacionam com a incidência da doença. Esses dados forneceram fortes evidências de que fatores ambientais são responsáveis pela maioria dos casos de câncer. Os tipos de câncer que são comuns em uma população, por exemplo, variam de país para país, e estudos dos indivíduos migrantes mostraram que são os fatores do local onde vivem e não de onde vieram que governam o risco de desenvolverem câncer. Embora seja difícil determinar quais os fatores específicos do ambiente ou estilo de vida que são críticos, e muitos ainda não são conhecidos, alguns deles já foram identificados com precisão. Assim, há muito tempo foi observado que o câncer cervical, que surge no epitélio que reveste a cérvice (colo) uterina, era mais comum em mulheres casadas do que em mulheres solteiras, indicando uma causa relacionada com a atividade sexual. Hoje sabemos, a partir dos estudos modernos de epidemiologia, que a maioria dos casos de câncer cervical envolve a infecção do epitélio cervical com certos subtipos de um vírus comum denominado vírus do papiloma humano, o qual é transmitido durante o intercurso sexual e pode, algumas vezes, provocar a proliferação descontrolada das células infectadas. Assim, com esse conhecimento, podemos prevenir a infecção, por exemplo, pela vacinação contra o vírus do papiloma. Essa vacina agora já está disponível, conferindo grande proteção se administrada em mulheres jovens antes de tornarem-se sexualmente ativas.

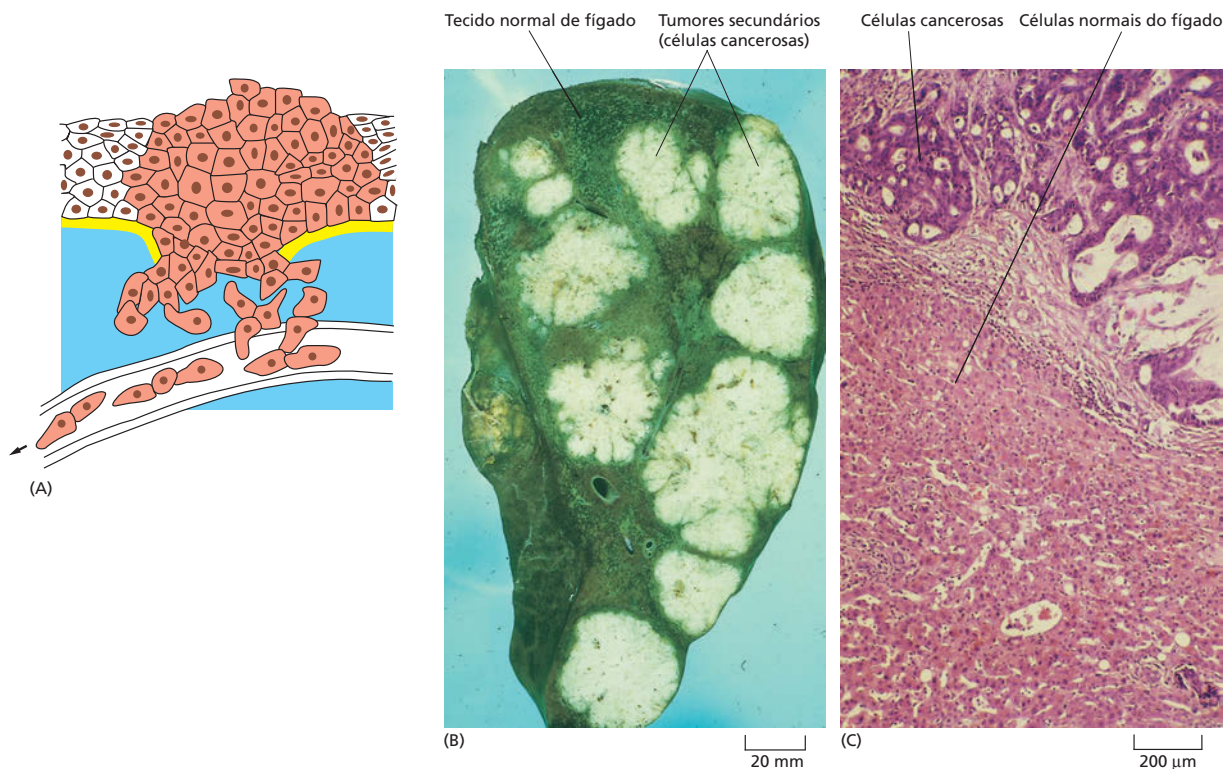



Figura 20-44 O câncer se espalha e invade os tecidos vizinhos. (A) Para dar origem a uma colônia em um novo local, as células do tumor primário de um epitélio devem atravessar a lâmina basal, migrar através do tecido conectivo e atingir a circulação sanguínea ou vaso linfático. Elas então têm de deixar o sangue ou a linfa e se estabelecer e sobreviver em um novo local. (B) Tumores secundários em um fígado humano, originado de um tumor primário de cólon. (C) Fotografia em maior aumento de um dos tumores secundários, corado diferencialmente para mostrar o contraste entre as células normais do fígado e as células tumorais. (B e C, cortesia de Peter Isaacson.)

Na grande maioria dos cânceres humanos, entretanto, os vírus não parecem ser os causadores. O câncer não é uma doença infecciosa, mas estudos epidemiológicos revelaram outros fatores. A obesidade, por exemplo, está correlacionada com o aumento do risco de câncer, e esse relacionamento parece ser causal. De longe, a causa ambiental mais importante de câncer é o fumo, o qual não é somente responsável por quase todos os tipos de câncer de pulmão, mas também aumenta a incidência de vários outros tipos de câncer, como o câncer de bexiga. Se pudéssemos impedir o uso do tabaco, estima-se que seria possível prevenir 30% de todas as mortes por câncer. Não se conhece nenhuma outra política de prevenção ou tratamento que teria tal impacto nas taxas de morte por câncer.

Como explicaremos a seguir, embora os fatores ambientais afetem a incidência de câncer e sejam críticos para algumas formas da doença, seria errôneo concluir que essa seja a causa fundamental do câncer em geral. Não importa o quanto tentamos prevenir o câncer com uma vida saudável, nunca seremos capazes de erradicá-lo completamente. Sempre confrontaremos casos que necessitarão tratamento. Para desenvolver tratamentos bem sucedidos, temos de entender a biologia das células cancerosas e os mecanismos responsáveis pelo crescimento e pela disseminação dos tumores.

O câncer se desenvolve pelo acúmulo de mutações

O câncer é fundamentalmente uma doença genética. Ele surge como consequência de mudanças patológicas na informação contida no DNA. Ele difere de outras doenças genéticas pelo fato de que as mutações causadoras de câncer são principalmente mutações somáticas, aquelas que ocorrem em células individuais do organismo maduro, diferente das mutações na linhagem germinativa, que são derivadas das células germinativas das quais o organismo multicelular como um todo se desenvolve.

A maioria dos agentes identificados, conhecidos por contribuírem para o câncer, que incluem a radiação ionizante e muitos químicos carcinogênicos, são mutagênicos. Eles causam mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA. Mesmo em um ambiente livre de tabaco, radioatividade e todos os outros agentes mutagênicos externos que nos preocupam, as mutações podem ocorrer espontaneamente como resultado de limitações fundamentais na precisão da replicação e no reparo do DNA (discutido no Capítulo 6). De fato, carcinógenos ambientais, que não o fumo, provavelmente são responsáveis por uma pequena fração das mutações responsáveis pelo câncer, e a eliminação desses fatores de risco externos ainda nos deixariam suscetíveis à doença.

Embora o DNA seja replicado e reparado com grande precisão, ocorre em média um erro a cada 10^9 ou 10^{10} nucleotídeos copiados, como discutimos no Capítulo 6. Isso significa que as mutações espontâneas ocorrem a uma taxa estimada de 10^{-6} a 10^{-7} mutações por gene por divisão celular, mesmo sem a presença de agentes externos. Cerca de 10^{16} divisões celulares ocorrem no organismo humano durante sua vida. Assim, cada gene é provável de sofrer uma mutação em mais de 10^9 ocasiões em um único indivíduo. Desse ponto de vista, o problema do câncer parece não ser por que ele ocorre, mas sim por que ele ocorre tão frequentemente.

É preciso mais de uma mutação para tornar uma célula normal em uma célula cancerosa. Ainda não se sabe exatamente quantas mutações são necessárias, mas é certo que mais de duas ou três. Essas mutações não ocorrem todas ao mesmo tempo, mas sequencialmente, em geral por um período de vários anos.

O câncer, portanto, é tipicamente uma doença do idoso porque leva um longo tempo para que uma linhagem celular acumule um grande número de mutações (ver Figura 6-20). De fato, a maioria das células cancerosas humanas não somente contêm muitas mutações, mas também são geneticamente instáveis. A **instabilidade genética** resulta de mutações que interferem na replicação precisa e manutenção do genoma e, portanto, aumenta a taxa de mutação. Algumas vezes, o aumento da taxa de mutação pode resultar de um defeito em uma das várias proteínas necessárias para o reparo de danos no DNA e que corrigem erros durante a replicação do DNA. Outras vezes, pode ocorrer um defeito nos mecanismos de verificação que normalmente impedem que uma célula com DNA danificado tente dividir antes que tenha finalizado o reparo (discutido no Capítulo 18). Alternativamente, pode ocorrer um erro na maquinaria da mitose. As consequências desses defeitos na utilização do DNA pelas células cancerosas são, com frequência, manifestadas em quebras e rearranjos cromossômicos resultando em um cariótipo grosseiramente instável e anormal (**Figura 20-45**). Acredita-se que o aumento da taxa de mutação desempenhe um papel importante, facilitando o desenvolvimento do câncer.

(A)

(B)

Figura 20-45 As células cancerosas frequentemente possuem cromossomos anormais refletindo sua instabilidade genética. No exemplo aqui descrito, os cromossomos foram preparados de células de câncer de mama em metáfase, espalhados em uma lâmina e corados com (A) coloração geral para DNA e (B) uma combinação de corantes fluorescentes que conferem uma cor para cada cromossomo humano. A coloração (apresentada em cores falsas) mostra múltiplas translocações, incluindo um cromossomo com dupla translocação (*seta branca*) constituído por dois pedaços do cromossomo 8 (em *verde*) e um pedaço do cromossomo 17 (em *roxo*). O cariótipo também contém 48 cromossomos, em vez do número normal, que é 46. (Cortesia de Joanne Davidson e Paul Edwards.)

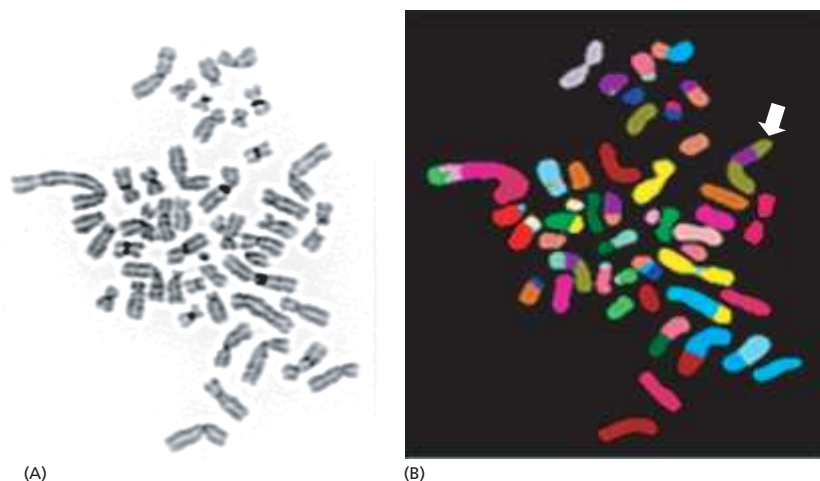



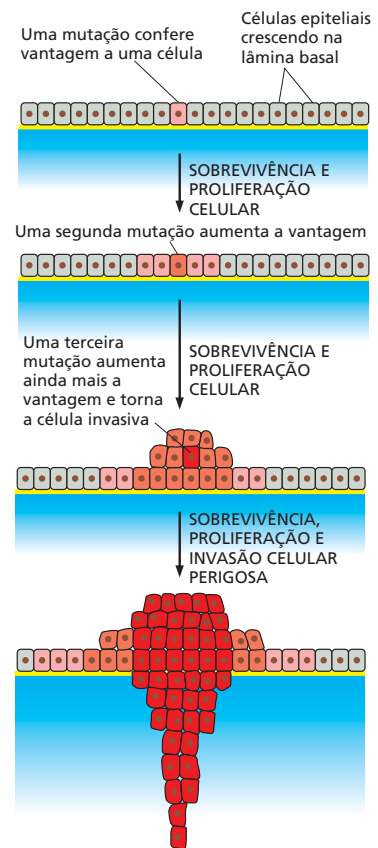
Figura 20-46 Os tumores são originados por repetidos ciclos de mutação e proliferação. O resultado final é um clone somente com células cancerosas malignas. Em cada passo, uma única célula sofre uma mutação que aumenta sua capacidade proliferativa, ou de sobrevivência, ou ambas, de modo que a progênie se torna o clone dominante no tumor. A proliferação desse clone acelera o próximo passo da progressão do tumor, aumentando o tamanho da população de células com risco de sofrerem mutações adicionais.

As células cancerosas adquirem propriedades que lhes conferem uma vantagem competitiva

As mutações que levam ao câncer não incapacitam as células mutantes. Ao contrário, elas fornecem a essas células uma vantagem competitiva com relação às células vizinhas. Essa vantagem das células mutantes leva ao desastre do organismo como um todo. A seleção natural favorece as células portadoras de mutações que aumentam a proliferação e sobrevivência celular, independentemente do efeito nas células vizinhas. Esses processos culminam na gênese das células cancerosas que se tornam prejudiciais dentro da população de células que formam o organismo, alterando sua estrutura regular. Quando uma população inicial de células mutantes cresce, ela evolui lentamente. Novas mutações aleatórias ocorrem nessas células, e algumas são favorecidas pela seleção natural (**Figura 20-46**). Fatores ambientais não mutagênicos e estilo de vida, como a obesidade, podem favorecer o desenvolvimento de câncer pela alteração das pressões seletivas que atuam nos tecidos do organismo. Por exemplo, a circulação de nutrientes ou hormônios pode auxiliar a proliferação e sobrevivência de células com mutações perigosas. Eventualmente, surgem células que possuem todas as anormalidades necessárias para crescer como câncer.

Para ser bem sucedida, uma célula cancerosa deve adquirir uma gama completa de propriedades anormais, uma coleção de novas habilidades subversivas. Uma célula-tronco epitelial que reveste o epitélio do intestino, por exemplo, deve sofrer mudanças que permitam que ela siga proliferando quando deveria parar. A célula e sua progênie devem ser capazes de deslocar as células vizinhas e atrair suprimento sanguíneo suficiente para nutrir o tumor em crescimento. Para que as células se tornem invasivas, elas devem adquirir a capacidade de digerir seu caminho pela lâmina basal do epitélio até os tecidos subjacentes. Para que as células se espalhem por outros tecidos – uma capacidade conhecida como *metástase* –, elas devem ser capazes de entrar e sair da circulação sanguínea ou dos linfonodos e se alojarem e sobreviver em novos locais (ver Figura 20-44).

Diferentes cânceres requerem diferentes combinações de propriedades. Apesar disso, podemos descrever uma relação geral de comportamento-chave das células cancerosas que as distinguem das células normais.

1. Elas têm uma dependência reduzida dos sinais de outras células para seu crescimento, sua sobrevivência e sua divisão. Isso ocorre, frequentemente, porque elas possuem mutações nos componentes das vias de sinalização celular por meio dos quais as células respondem a tais compromissos sociais. Uma mutação no gene *Ras* (discutido no Capítulo 16) pode, por exemplo, causar uma sinalização intracelular para proliferação mesmo na ausência de sinais extracelulares que seriam normalmente necessários para ativá-las, como uma campainha que toca mesmo que ninguém esteja apertando o botão.
2. As células cancerosas são menos propensas do que as células normais a morrerem por *apoptose*. Essa aversão ao suicídio é frequentemente causada por mutações nos genes que regulam o programa intracelular de morte (discutido no Capítulo 18). Por exemplo, cerca de 50% de todos os cânceres humanos perderam ou sofreram uma mutação no gene *p53*. A proteína p53 normalmente atua como parte de um mecanismo de verificação que faz com que a célula pare de dividir-se (ver Figura 18-13) ou morra por apoptose quando seu DNA está danificado. Uma quebra cromossômica, por exemplo, se não for reparada, geralmente ira fazer com que a célula

QUESTÃO 20-8

Cerca de 10^{16} divisões celulares ocorrem no corpo humano durante a vida do indivíduo; mesmo assim, o corpo de um adulto consiste em cerca de 10^{13} células. Por que esses dois números são tão diferentes?

cometa suicídio. Se a célula apresenta um defeito na p53, ela pode sobreviver e dividir-se, criando células-filhas extremamente anormais que podem tornar-se malignas.

3. Diferentemente da maioria das células humanas normais, as células cancerosas podem, com frequência, proliferar indefinidamente. A maioria das células somáticas humanas normais somente irá dividir-se por um número limitado de vezes em cultura; após esse período, elas permanecerão em estado latente, aparentemente porque não produzem a enzima telomerase, de modo que os telômeros das extremidades dos cromossomos se tornaram muito curtos (ver p. 210). Normalmente, as células cancerosas quebram essa barreira, reativando a produção da enzima telomerase que mantém o tamanho dos telômeros.
4. A maioria das células cancerosas, como descrito, é geneticamente instável, com taxa de mutação bastante aumentada.
5. As células cancerosas são anormalmente invasivas, em geral porque não possuem moléculas de adesão celular específicas, como as caderinas, que mantêm as células normais no local adequado.
6. As células cancerosas podem, frequentemente, sobreviver e proliferar em tecidos estranhos para formar tumores secundários (metástases), ao passo que a maioria das células normais morre quando no local inadequado. Ainda não se sabe exatamente quais alterações moleculares conferem essa capacidade.

Para entender a biologia molecular do câncer, temos de ser capazes de identificar as mutações que dão origem a essas formas anormais de comportamento.

Diversos tipos de genes são críticos para o câncer

Uma grande variedade de estratégias têm sido empregadas para identificar genes e mutações que são críticas para o desenvolvimento do câncer, e, embora muitos desses genes tenham sido identificados, ainda há muitos a serem descobertos.

Em alguns casos, mutações perigosas são aquelas que tornam o gene afetado hiperativo. Essas mutações têm um efeito dominante, somente uma cópia do gene precisa estar mutada para que o dano ocorra, e o gene mutante é denominado **oncogene** (**Figura 20-47A**). A forma normal do gene correspondente é

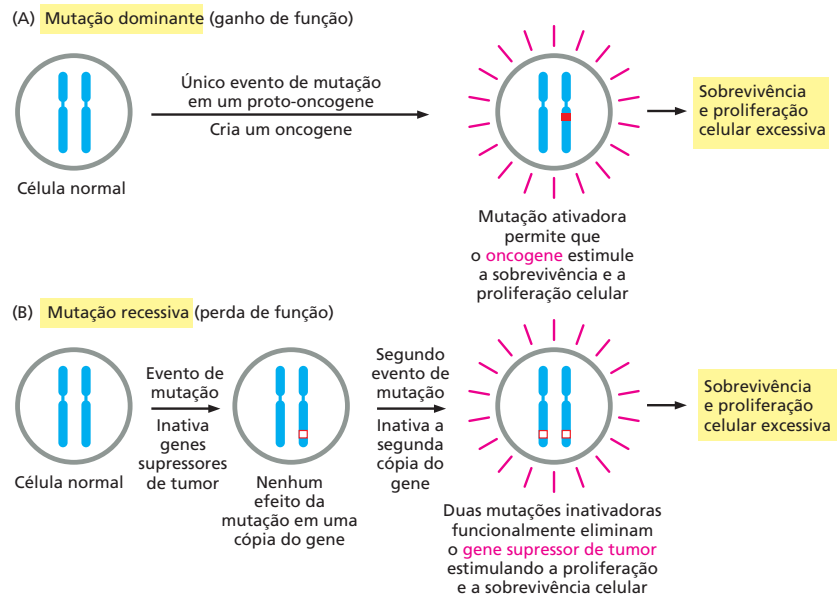



Figura 20-47 Os genes que são críticos para o câncer são classificados como proto-oncogenes ou genes supressores de tumor conforme o perigo da mutação, se dominante ou recessiva. Os oncogenes atuam de forma dominante: uma mutação com ganho de função em uma única cópia do proto-oncogene pode levar a célula a tornar-se uma célula cancerosa. Por outro lado, mutações em genes supressores de tumor geralmente atuam de forma recessiva: a função dos dois alelos deve ser perdida para que a célula se torne cancerosa. Neste diagrama, mutações ativadoras estão representadas por *caixas vermelhas* sólidas, e mutações inativadoras, por *caixas vermelhas vazadas*.

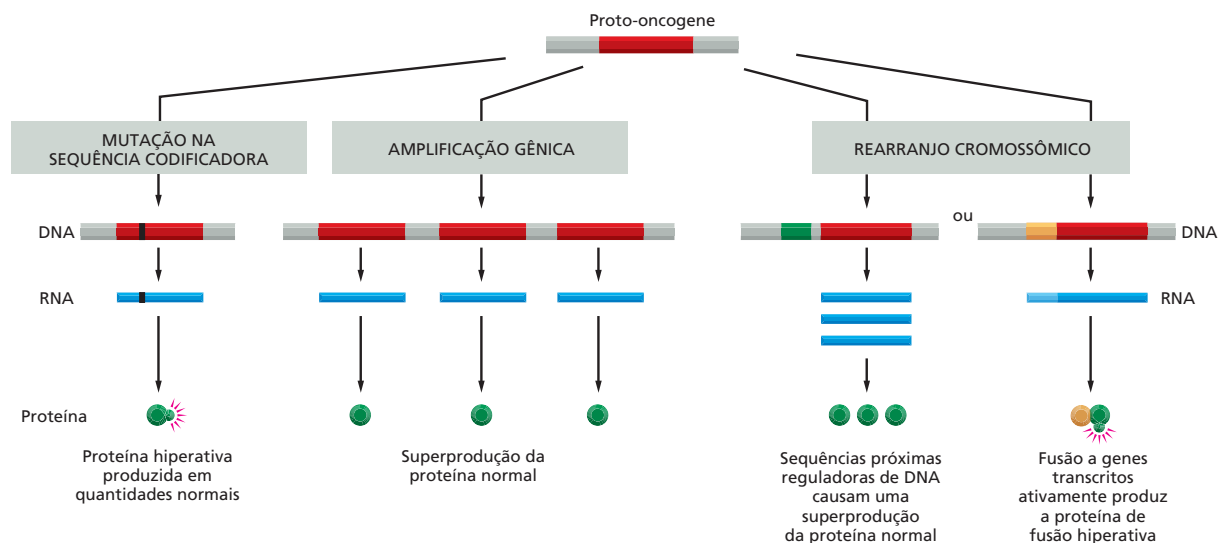



Figura 20-48 Vários tipos de alterações genéticas podem converter um proto-oncogene em um oncogene. Em cada caso, as mudanças levam a um aumento na função do gene.

denominada **proto-oncogene**. A **Figura 20-48** mostra várias formas pelas quais pode ocorrer a conversão de proto-oncogene em oncogene.

Para outros genes, o perigo reside em mutações que destroem a função do gene. Normalmente essas mutações são recessivas, as duas cópias do gene devem ser perdidas ou inativadas para que seu efeito se manifeste, e o gene afetado é denominado **gene supressor de tumor** (ver Figura 20-47B). Os genes supressores de tumor foram identificados pela primeira vez em estudos envolvendo genética humana. Ocasionalmente, são encontrados indivíduos que herdaram uma mutação em um gene supressor de tumor, e embora uma cópia do gene seja suficiente para o comportamento normal da célula, as células desse indivíduo estão a apenas um passo mutacional para a perda total da função gênica, contra dois eventos que devem ocorrer para que isso aconteça em um indivíduo normal. A doença ocorre em maior frequência, e em média em um período mais precoce, em virtude do menor número de mutações adicionais necessárias, algumas vezes ocorrendo mesmo na infância. As famílias que portam tais mutações estão, portanto, propensas a desenvolver câncer.

Os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor são de vários tipos, correspondendo a diversos tipos de erro de comportamento apresentado pelas células cancerosas. Alguns desses genes codificam para os fatores de crescimento, receptores ou, como o *Ras*, para componentes das vias de sinalização intracelular que ativam os fatores de crescimento. Outros codificam para proteínas de reparo do DNA, para mediadores da resposta a danos no DNA, como a p53, ou para reguladoras do ciclo celular ou para a apoptose. Outros, ainda, como já mencionamos, codificam para moléculas de adesão celular, como as caderinas. A **Figura 20-49** dá uma ideia dessa diversidade.

O câncer colorretal ilustra como a perda de um gene pode levar ao crescimento de um tumor

O câncer colorretal proporciona um exemplo bem estudado para mostrar, primeiro, como um gene supressor de tumor pode ser identificado e, segundo, como essa identificação leva ao entendimento dos mecanismos moleculares básicos responsáveis pelo crescimento de um tipo comum de tumor. O câncer colorretal surge no epitélio que reveste o cólon e o reto, sendo que a maioria dos casos ocorre em pessoas idosas sem qualquer causa hereditária aparente. Uma pequena proporção dos casos, entretanto, ocorre em famílias que são excepcionalmente propensas à doença e apresentam um início precoce. Em um grupo de famílias, a predisposição ao câncer foi identificada em uma mutação herdada em

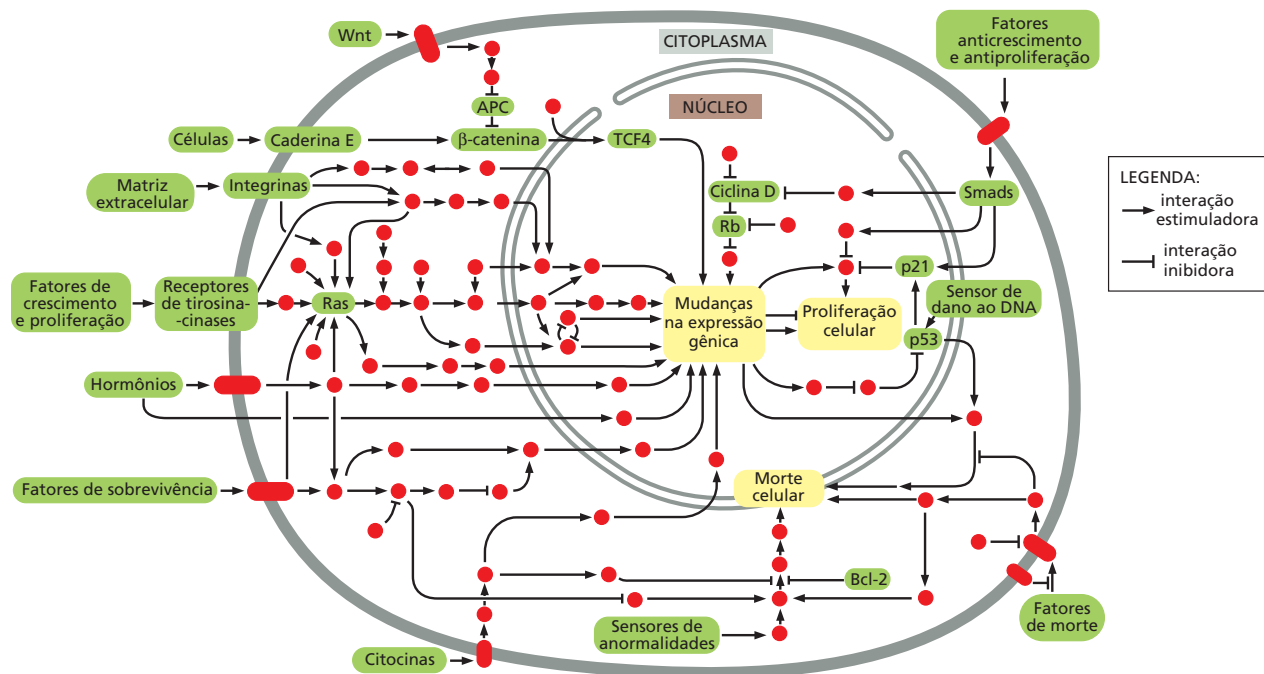



Figura 20-49 Vários tipos de genes são críticos para o câncer. O desenho mostra as principais vias de sinalização relevantes para o câncer em células humanas, indicando a localização intracelular de algumas proteínas modificadas por mutações no câncer. Os produtos dos oncogenes e dos genes supressores de tumor ocorrem, frequentemente, dentro da mesma via. As proteínas sinalizadoras individuais estão indicadas por *círculos vermelhos sólidos* com os componentes críticos para o câncer, e os mecanismos de controle discutidos neste livro estão em *verde*. Interações estimuladoras e inibidoras entre os componentes estão indicadas por setas e barras, respectivamente, como mostra a legenda. (Adaptada de D. Hanahan e R.A. Weinberg, *Cell* 100:57-70, 2000. Com permissão de Elsevier.)

uma enzima de reparo do DNA, já discutido no Capítulo 6. Em outra classe de pacientes com câncer colorretal hereditário, ocorre uma mutação diferente, levando a um fenótipo completamente distinto. Os indivíduos afetados desenvolvem câncer colorretal no início da vida adulta, e o início da doença é precedido pelo desenvolvimento de centenas ou milhares de pequenos crescimentos tumorais denominados pólipos, no revestimento do cólon e do reto. Através de estudos familiares, a anormalidade pode ser detectada em deleções ou inativações de um gene denominado *Adenomatous Polyposis Coli* (*APC*, *polipose adenomatosa de cólon*). Os indivíduos afetados herdam uma cópia mutante e uma cópia normal do gene. O seu câncer surge de células que sofreram uma mutação somática que inativa a outra cópia normal do gene. E a maioria dos pacientes com câncer colorretal? Aqueles que herdaram duas cópias normais do gene *APC* e não apresentam nenhuma condição hereditária de câncer ou qualquer história familiar significante? Quando seus tumores são analisados, ocorre que em mais de 60% dos casos as células tumorais perderam as duas cópias desse gene, provavelmente por duas mutações somáticas independentes, embora as células tumorais dos tecidos adjacentes apresentem as duas cópias normais do gene *APC*.

Tudo isso identifica claramente o *APC* como um gene supressor de tumor, e, conhecendo sua sequência e o fenótipo mutante, pode-se decifrar como sua perda causa o início do desenvolvimento do câncer. Como descrito no quadro "**Como Sabemos**" (p. 725-726), o gene *APC* codifica para uma proteína inibidora que normalmente restringe a ativação da via de sinalização Wnt, a qual está envolvida na estimulação da proliferação celular das criptas que revestem o intestino. Quando o *APC* é perdido, a via é hiperativada, e as células epiteliais proliferam em excesso, produzindo pólipos (**Figura 20-51**). Dentro dessa massa de tecido em crescimento, outras mutações podem ocorrer, resultando no câncer invasivo (**Figura 20-52**).

COMO SABEMOS:
ENTENDENDO OS GENES CRÍTICOS PARA O CÂNCER

A pesquisa por genes críticos para o desenvolvimento do câncer algumas vezes iniciou com uma família que mostrou predisposição hereditária a uma determinada forma da doença. Como vimos, o *APC*, um gene supressor de tumor que está frequentemente deletado ou inativado em pessoas com câncer colorretal, foi identificado pela procura de defeitos genéticos em famílias propensas à doença, mas a identificação desses genes é somente metade da batalha. O próximo passo é determinar o que o gene faz em uma célula normal e por que as alterações nesse gene precipitam o câncer.

Culpa por associação

Determinar o que o gene – ou seu produto proteico – faz dentro da célula não é uma tarefa simples. Imagine isolar uma proteína não caracterizada e saber que ela atua como uma proteína-cinase. Essa informação não revela como essa proteína funciona no contexto de uma célula viva. Quais são seus alvos proteicos? Em quais tecidos ela está ativa? Qual seu papel no crescimento ou no desenvolvimento do organismo? Informações adicionais são necessárias para entender o contexto no qual a atividade bioquímica é empregada.

A maioria das proteínas não atua isoladamente. Elas interagem com outras proteínas dentro da célula. Assim, uma maneira de iniciar a decifrar o papel biológico da proteína é identificar seus padrões de ligação. Se uma proteína, não caracterizada, interage com uma proteína cujo papel celular é conhecido, provavelmente a função dessa proteína deve, de alguma forma, estar relacionada. Talvez o método mais simples para a identificação de proteínas que se ligam uma à outra fortemente seja a coimunoprecipitação (ver Painel 4-3, p.144-145). Nessa técnica, um anticorpo é usado para capturar e precipitar uma proteína-alvo específica de um extrato preparado pela lise de células. Se essa proteína-alvo estiver fortemente associada a outra proteína, a proteína companheira também irá precipitar. Essa foi a estratégia usada para caracterizar a APC.

Dois grupos de pesquisadores usaram anticorpos contra a APC para isolar a proteína de extratos preparados de células humanas em cultura. Os anticorpos capturaram a APC juntamente com uma segunda proteína. Quando os pesquisadores examinaram a sequência de aminoácidos desta proteína associada, eles identificaram como sendo a β-catenina.

A descoberta de que a APC interage com a β-catenina levou, inicialmente, a um erro sobre o papel da APC no câncer colorretal. Em mamíferos, a β-catenina era conhecida por seu papel nas junções aderentes entre as células, onde atuava como um ligante para conectar as moléculas de caderina ao citoesqueleto intracelular de actina (ver, por exemplo, Figura 20-24). Assim, por algum tempo, os cientistas pensaram que a APC poderia estar envolvida na adesão celular. Entretanto, em poucos anos, descobriu-se que a β-catenina também possuía uma função completamente diferente e que a interação com a APC é importante no câncer por uma razão muito diferente.

Moscas sem asas

Não muito antes da descoberta de que a APC se ligava à β-catenina, os biólogos do desenvolvimento trabalhando com *Drosophila* observaram que a proteína β-catenina humana era muito similar à sequência de uma proteína de *Drosophila* denominada Armadillo. A Armadillo era conhecida por ser uma proteína-chave em uma via de sinalização que desempenha um papel importante no desenvolvimento normal da mosca-das-frutas. A via é ativada por uma família de moléculas sinalizadoras denominadas proteínas Wnt, e o membro fundador da família gênica *Wnt* foi denominado *wingless*, pelo seu fenótipo mutante. As proteínas Wnt se ligam a receptores da superfície celular ativando a cascata de sinalização intracelular que leva à ativação de uma série de genes que influenciam o crescimento, a divisão e a diferenciação celular. Mutações em qualquer uma das proteínas dessa via leva a erros no desenvolvimento que rompem o plano corporal básico da mosca. A mutação menos devastadora faz com que a mosca não forme asas durante seu desenvolvimento. Entretanto, a maioria das mutações resulta na morte do embrião. Em qualquer caso, o dano ocorre e parece que por feitos na expressão gênica. Isso sugere fortemente que a Armadillo e, portanto, sua homóloga de vertebrados, a β-catenina, não era apenas ferramentas do aparato de adesão celular, mas que de alguma forma mediava o controle da expressão gênica.

A via Wnt foi descoberta e estudada intensivamente na mosca-das-frutas, mas se verificou que uma série de proteínas similares controla muitos aspectos do desenvolvimento dos vertebrados, incluindo camundongos e o homem. Algumas das proteínas da via Wnt atuam de forma similar em *Drosophila* e em vertebrados. A ligação direta entre a β-catenina e a expressão gênica se tornou clara em estudos com células de mamíferos. Como a APC pode ser usada como "isca" para identificar sua companheira β-catenina por imunoprecipitação, a β-catenina pode ser usada como isca para identificar a próxima proteína da cadeia de causa e efeito. Descobriu-se que essa era uma proteína reguladora da transcrição denominada LEF-1/TCF, ou TCF. Observou-se também que havia uma correspondente em *Drosophila* na via Wnt, e uma combinação da genética de *Drosophila* e biologia celular de mamíferos revelou como atua o mecanismo de controle gênico.

A Wnt transmite seu sinal promovendo o acúmulo de β-catenina livre (ou, nas moscas, da Armadillo), isto é, uma β-catenina que não está ligada às junções aderentes. Essa proteína livre migra do citoplasma para o núcleo. Ali, ela se liga à proteína reguladora de transcrição TCF, criando um complexo que ativa a transcrição de vários genes responsivos a Wnt, incluindo genes cujos produtos estimulam a proliferação celular (**Figura 20-50**).

A APC regula a atividade dessa via facilitando a degradação da β-catenina e, portanto, impedindo-a de ativar a TCF em células onde não há o sinal Wnt (ver Figura 20-50). A perda da APC permite que os níveis de β-catenina se elevem de modo que a TCF seja ativada e os genes responsivos a Wnt sejam ativados mesmo na ausência de Wnt, mas como isso causa o câncer colorretal? Para descobrir, os pesquisadores usaram camundongos que não possuíam o TCF4, um membro da família gênica TCF que é expresso, especificamente, no revestimento do intestino.

Histórias das criptas

Embora pareça sem intuição, uma das formas mais diretas de se saber o que um gene faz é ver o que acontece no organismo quando esse gene está ausente. Se o processo celular que está ausente ou alterado for identificado, pode-se então começar a decifrar a função gênica.

Considerando esse fato, os pesquisadores produziram camundongos nocautes nos quais o gene que codifica a TCF4 foi rompido. A mutação é letal. Camundongos que não possuem o gene TCF4 morrem logo após o nascimento. No entanto, os animais mostraram uma anormalidade interessante no intestino. As criptas intestinais, bem como suas populações de células-tronco para renovação do revestimento (ver Figura 20-36), não se desenvolvem. Os pesquisadores concluíram que a TCF4 é, normalmente, responsável pela manutenção do conjunto de células-tronco do intestino em proliferação.

Quando a APC não está presente, vemos o outro lado da moeda: sem a APC para promover sua degradação, ocorre um acúmulo de β-catenina em quantidades excessivas que se ligam ao regulador de transcrição TCF4, superativando os genes responsivos ao TCF4. Isso induz à formação de pólipos pela promoção da proliferação inadequada das células-tronco do intestino. As células da progênie diferenciadas continuam a ser produzidas e descartadas no lúmen do intestino, mas a população de células das criptas cresce com mais rapidez do que a capacidade do mecanismo de descarte. O resultado é um aumento das criptas e um aumento estável no número de criptas. A massa de tecido em crescimento protunde para o interior do intestino como um pólipo (ver Figura 20-51). Mutações posteriores são necessárias para converter esse tumor primário em câncer invasivo.

Mais de 60% dos tumores colorretais humanos possuem uma mutação no gene *APC*. Na minoria dos tumores que mantém a APC funcional, cerca de um quarto apresentam mutações que ativam a β-catenina. Essas mutações tendem a produzir proteínas β-catenina mais resistentes à degradação e assim produzem o mesmo efeito que a perda da APC. De fato, mutações que aumentam a atividade da β-catenina foram encontradas em uma grande variedade de outros tipos de tumores, incluindo melanomas, câncer de estômago e câncer de fígado. Assim, a via de sinalização Wnt fornece múltiplos alvos de mutações que podem incentivar o desenvolvimento de câncer.

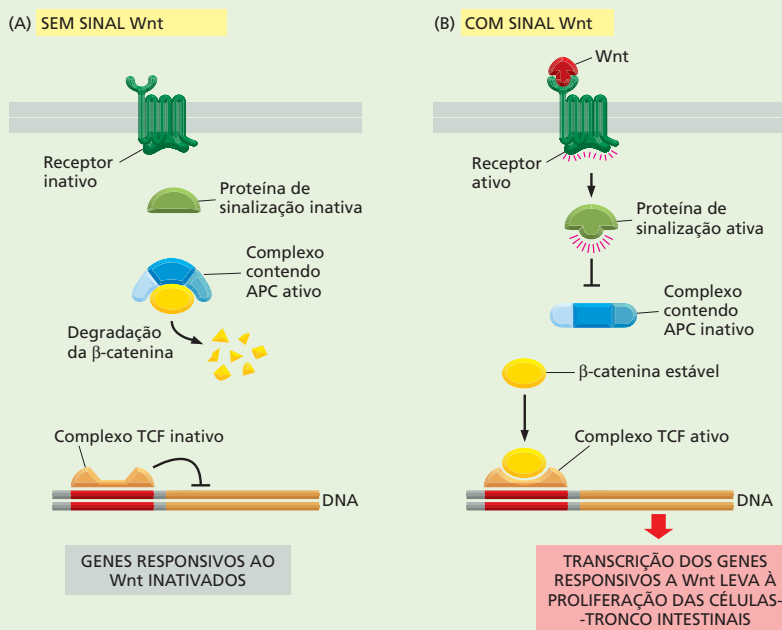



Figura 20-50 A proteína APC mantém a via de sinalização Wnt inativa quando as células não estão expostas à proteína Wnt. Isso ocorre pela promoção da degradação da molécula de sinalização β-catenina. Na presença de Wnt, ou na ausência de APC ativa, a β-catenina livre se torna abundante e se combina com a proteína reguladora do gene TCF, ativando a transcrição dos genes-alvo Wnt e a proliferação das células-tronco na cripta intestinal. No cólon, mutações que inativam APC levam à formação de tumores, como causa da ativação excessiva da via Wnt.

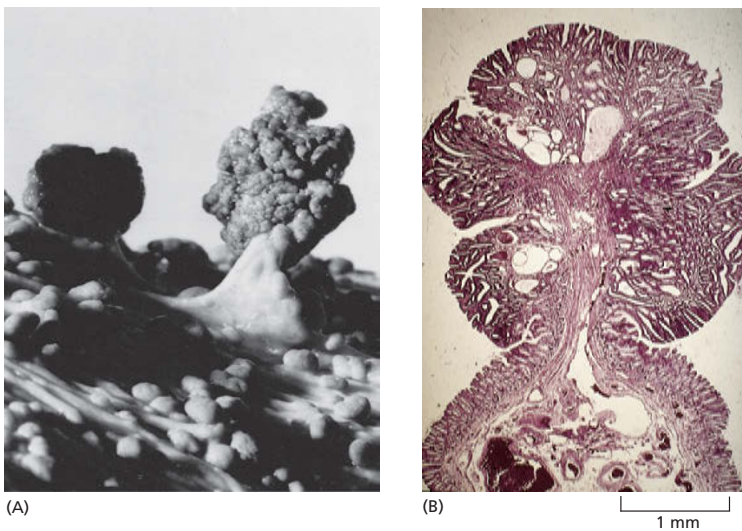



Figura 20-51 O câncer colorretal frequentemente inicia com a perda do gene supressor de tumor *APC* levando ao crescimento de pólipos. (A) Milhares de pequenos pólipos e alguns maiores são observados no revestimento do cólon de um paciente com uma mutação hereditária no gene *APC* (um ou dois pólipos podem ser observados em uma pessoa geneticamente normal). Com outras mutações, alguns desses pólipos irão progredir e tornar-se câncer maligno se esse tecido não for removido cirurgicamente. (B) Corte transversal de um pólipo. Note a grande quantidade de profundas invaginações epiteliais, que correspondem às criptas de células proliferativas completamente anormais. (A, cortesia de John Northover e Cancer Research UK; B, cortesia de Anne Campbell.)

A compreensão da biologia celular do câncer abre caminho para novos tratamentos

Quanto mais aprendemos os truques que as células cancerosas usam para sobreviver, proliferar e se dispersar, melhores as chances de encontrar maneiras de combatê-las. A questão é difícil porque as células cancerosas são mutáveis e rapidamente desenvolvem resistência aos tratamentos usados para combatê-las. Além disso, como as mutações surgem aleatoriamente, cada caso de cada tipo de câncer é capaz de ter sua própria combinação de genes mutados. Assim, um tratamento único pode não funcionar em todos os pacientes. Além disso, o câncer geralmente não é detectado até que o tumor primário atinja o diâmetro de um centímetro ou mais, quando então já consiste em centenas de milhões de células geneticamente diversas e que, com frequência, já produziram metástases (Figura 20-53).

Apesar das dificuldades, muitos cânceres podem ser tratados eficientemente, e as perspectivas futuras para mais e melhores tratamentos são claras. A cirurgia permanece a tática mais eficiente em muitos casos, e as técnicas cirúrgicas estão melhorando continuamente. Se uma célula cancerosa não se espalhar, o câncer pode ser curado simplesmente com cirurgia de excisão. Quando a cirurgia falhar, podem empregar-se terapias com base nas peculiaridades intrínsecas das células cancerosas. A ausência de mecanismos de verificação normais, por exemplo, auxilia a tornar as células cancerosas vulneráveis aos danos no DNA. Uma célula normal irá interromper sua proliferação até que o dano seja reparado, mas uma célula cancerosa poderá prosseguir proliferando, produzindo células-filhas que podem morrer porque herdaram um conjunto de cromossomos incompleto e danificados. Provavelmente por essa razão, as células cancerosas podem, com frequência, ser mortas por doses de radioterapia ou de quimioterapia que danifica o DNA, mas que deixa as células adjacentes relativamente intactas.

Esses tratamentos foram estabelecidos há muito tempo, mas novas estratégias têm sido desenvolvidas. Em alguns casos, como a perda dos controles de verificação, a mesma característica que auxilia a tornar as células cancerosas malignas também às tornam vulneráveis, permitindo que sejam mortas com tratamentos adequadamente direcionados. Alguns cânceres de mama e ovário, por exemplo, devem sua instabilidade genética à ausência de uma proteína (Brca1 ou Brca2) necessárias ao reparo preciso de quebras na fita dupla de DNA (discutido no Capítulo 6). As células cancerosas sobrevivem contando com uma maquinaria alternativa de reparo do DNA. Um fármaco que inibe uma dessas vias alternativas de reparo do DNA mata as células cancerosas aumentando sua instabilidade

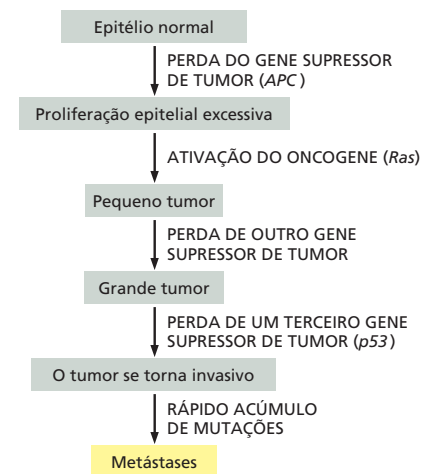



Figura 20-52 Um pólipo no revestimento do intestino, causado pela perda do gene *APC*, pode progredir para câncer pelo acúmulo de mutações adicionais. O diagrama mostra a sequência de mutações que podem causar um caso típico de câncer colorretal. Uma sequência de eventos, como descrito, ocorre, normalmente, entre 10 e 20 anos ou mais. Embora a maioria do câncer colorretal inicie com a perda do gene supressor de tumor *APC*, a sequência subsequente de mutações é variável; mesmo assim, muitos pólipos nunca se tornam cancerosos.

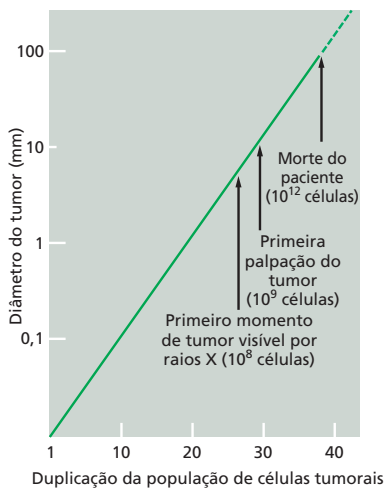



Figura 20-53 Um tumor geralmente não é diagnosticado até que tenha crescido atingindo milhões de células. O crescimento típico de um tumor é descrito no gráfico em escala logarítmica. Anos podem passar-se antes que o tumor se torne detectável. O tempo de duplicação de um tumor de mama típico, por exemplo, é de 100 dias.

genética a tal ponto que as células morrem por fragmentação cromossômica durante a tentativa de divisão. Células normais com maquinaria intacta do reparo da fita dupla de DNA são pouco afetadas, e o fármaco parece ter poucos efeitos colaterais.

Outra estratégia promissora é bloquear a formação de novos vasos sanguíneos que normalmente invadem um tumor em crescimento (**Animação 20.8**). Essa estratégia interrompe o crescimento do tumor, retirando o suprimento sanguíneo das células. Outra série de estratégias se baseiam em várias maneiras de usar o sistema imune para matar as células tumorais, beneficiando-se de moléculas de superfície celular específicas dos tumores como alvo do ataque. A vacinação com moléculas específicas dos tumores pode estimular o sistema imune contra o tumor dos próprios pacientes, ou antibióticos contra essas moléculas tumorais podem ser produzidos *in vitro* e injetados nos pacientes para marcar as células tumorais para destruição.

Em alguns cânceres, é possível ter como alvo os produtos específicos diretamente dos oncogenes para bloquear sua ação indesejável. Como na leucemia mieloide crônica (LMC), sabe-se que o mau comportamento das células cancerosas depende de uma proteína sinalizadora mutante (uma proteína tirosina-cinase) que faz com que a célula prolifere quando não deveria. Uma pequena molécula, denominada Gleevec, foi desenhada para bloquear a atividade dessa cinase (**Figura 20-54**). Os resultados têm sido bem sucedidos. Em muitos pacientes, a proliferação anormal e a sobrevivência das células leucêmicas é fortemente inibida, e observa-se uma remissão prolongada dos sintomas. O mesmo fármaco é eficaz em outros cânceres contendo oncogenes similares.

Com esses exemplos, podemos esperar que, em breve, equipados com nosso moderno entendimento da biologia molecular do câncer, seja possível desenvolver métodos racionais eficazes de tratamento para uma grande quantidade de formas dessa doença. Por outro lado, a prioridade no câncer tem-nos ensinado muitas coisas importantes acerca da biologia molecular básica. As aplicações desses conhecimentos vão além do tratamento do câncer, pois esse conhecimento nos permitiu esclarecer a maneira com que todas as coisas vivas atuam.

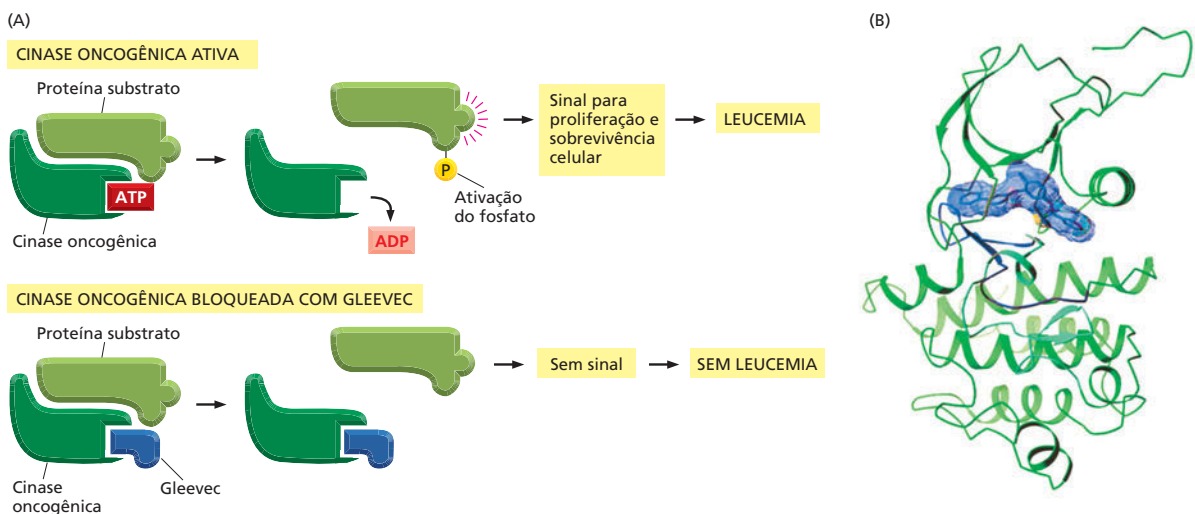



Figura 20-54 O Gleevec bloqueia a atividade de uma proteína oncogênica que inibe certos tipos de câncer. (A) Na leucemia mieloide crônica, um câncer no qual ocorre uma superprodução de leucócitos, o comportamento celular patológico é quase sempre resultante de uma mutação específica (uma translocação cromossômica) que afeta um gene denominado *Abl*, que codifica uma proteína tirosina-cinase. A mutação cria uma forma oncogênica do *Abl*, cujo produto proteico é hiperativo, fosforilando outras proteínas quando não deveria, produzindo sinais intracelulares que provocam a produção excessiva de leucócitos. O Gleevec se liga ao sítio de ligação de ATP da cinase hiperativa impedindo a transferência do grupo fosfato do ATP para a tirosina na sua proteína-alvo. Essa inibição bloqueia o envio do sinal de proliferação e sobrevivência celular. O Gleevec também é eficaz contra alguns cânceres envolvendo oncogenes que codificam para tirosina-cinases semelhantes à Abl. (B) Estrutura do complexo Gleevec (em *azul*) com o domínio da tirosina-cinase da proteína Abl (*diagrama de fitas*) determinado por cristalografia de raios X. (B, de T. Schindler *et al.*, *Science* 289:1938-1942, 2000. Com permissão da AAAS.)

CONCEITOS ESSENCIAIS

- Os tecidos são compostos de células e matriz extracelular.
- Nos vegetais, cada célula circunda a si mesma com uma matriz extracelular na forma de parede celular composta por celulose e outros polissacarídeos.
- As células vegetais nuas são frágeis, mas podem exercer uma pressão osmótica na parede celular circundante para manter o tecido túrgido.
- As fibras de celulose da parede celular das plantas fornecem a força elástica, outros componentes da parede celular proporcionam resistência à compressão.
- A orientação da deposição da celulose controla a orientação do crescimento da planta.
- O tecido conectivo animal fornece o suporte mecânico e consiste em matriz extracelular com células esparsas.
- As proteínas e os polissacarídeos da matriz são produzidos pelas células do tecido conectivo imersas nesse. Na maioria dos tecidos conectivos, essas células são denominadas fibroblastos.
- Na matriz extracelular dos animais, a força elástica é proporcionada pela proteína fibrosa colágeno.
- As proteínas integrinas transmembrana ligam as proteínas da matriz extracelular, como o colágeno e a fibronectina, ao citoesqueleto intracelular.
- Os glicosaminoglicanos (GAGs), covalentemente ligados a proteínas para formar os proteoglicanos, atuam como preenchedores de espaços na matriz extracelular proporcionando a resistência à compressão.
- As células mantidas unidas nas camadas epiteliais revestem as superfícies internas e externas do corpo dos animais.
- Nas camadas epiteliais, diferentemente do tecido conectivo, a tensão é transmitida diretamente de célula à célula através das junções celulares.
- Proteínas da família das caderinas atravessam a membrana da célula epitelial e se ligam a caderinas similares nas células epiteliais adjacentes.
- Nas junções aderentes, as caderinas estão ligadas intracelularmente aos filamentos de actina. Nos desmossomos, elas estão ligadas a filamentos de queratina.
- Feixes de actina conectados de uma célula à outra através do epitélio podem contrair, dobrando o epitélio.
- Os hemidesmossomos ligam a porção basal da célula epitelial à lâmina basal, uma camada especializada de matriz extracelular.
- As junções ocludentes selam uma célula epitelial à sua célula vizinha, impedindo a difusão de moléculas solúveis em água através do epitélio.
- As junções tipo fenda formam canais que permitem a passagem de pequenas moléculas e íons de uma célula à outra. Os plasmodesmata, nos vegetais, têm a mesma função, mas estrutura diferente.
- A maioria dos tecidos dos vertebrados são misturas complexas de tipos celulares que estão sujeitas à renovação contínua.
- A estrutura do organismo adulto é mantida e renovada pelos mesmos processos básicos que geram o embrião: a proliferação celular, o movimento celular e a diferenciação celular. Como no embrião, esses processos são controlados pelas comunicações celulares, adesões seletivas célula-célula e memória celular.
- Células terminalmente diferenciadas são produzidas a partir das células-tronco, em geral por meio da produção e da proliferação de células precursoras.

- As células-tronco embrionárias (ES) podem ser mantidas indefinidamente em cultura e permanecem capazes de se diferenciarem em qualquer tipo celular do organismo.
- As células-tronco pluripotentes induzidas (células iPS), que se assemelham as células ES, podem ser produzidas a partir de células do organismo humano adulto pela expressão artificial de um pequeno grupo de genes fundamentais.
- As células cancerosas não obedecem às restrições sociais que normalmente mantêm a organização dos tecidos. Elas proliferam quando não deveriam, sobrevivem quando não deveriam e invadem regiões onde a que não pertencem.
- O consumo de tabaco causa mais câncer do que qualquer mutagênico ambiental.
- O câncer surge do acúmulo de muitas mutações em uma única linhagem de célula somática.
- As células cancerosas são geneticamente instáveis, apresentando taxas mais elevadas de mutações. Muitas apresentam anormalidades cromossômicas grosseiras.
- As células cancerosas expressam, tipicamente, a telomerase, que permite que elas continuem a se dividir quando deveriam parar.
- A maioria das células cancerosas humanas possui mutações no gene *p53*, o que permite que elas sobrevivam e se dividam mesmo com danos em seu DNA.
- As mutações que promovem o câncer convertem proto-oncogenes em oncogenes, os quais são hiperativos, ou inativam genes supressores de tumor.
- Os genes supressores de tumor podem, algumas vezes, ser identificados pelo estudo de famílias propensas a cânceres raros que herdam uma cópia do gene mutada.
- Conhecendo as anormalidades moleculares nas células de cânceres específicos, podemos, agora, começar a desenvolver tratamentos-alvo eficazes.

TERMOS CHAVE

junções aderentes
apical
basal
lâmina basal
caderina
câncer
junção celular
parede celular
microfibrila de celulose
colágeno
tecido conectivo
desmossomo
matriz extracelular
célula-tronco embrionária (ES)
clonagem terapêutica
epitélio
fibroblasto
fibronectina
proteína Wnt
sinalização Wnt
junção tipo fenda
instabilidade genética
glicosaminoglicano (gag)
hemidesmossomo
célula-tronco pluripotente induzida (ips)
integrina
metástase
oncogene
plasmodesma (plural=plasmodesmata)
proteoglicano
clonagem reprodutiva
proto-oncogene
células-tronco
junção ocludente
tecido
gene supressor de tumor

TESTE SEU CONHECIMENTO

QUESTÃO 20-9

Quais das seguintes afirmativas estão corretas? Explique sua resposta.

A. As junções tipo fenda conectam o citoesqueleto de uma célula à célula vizinha ou à matriz extracelular.

B. Uma folha murcha pode ser comparada a um pneu vazio de bicicleta.

C. Em virtude da sua estrutura rígida, os proteoglicanos podem suportar uma grande quantidade de força de compressão.

D. A lâmina basal é uma camada especializada de matriz extracelular a qual as camadas de células epiteliais estão ligadas.

E. As células da epiderme são descamadas continuamente e renovadas a cada poucas semanas. Para uma tatuagem permanente, portanto, é necessário depositar o pigmento abaixo da epiderme.

F. Embora as células-tronco não sejam diferenciadas, elas são especializadas e, portanto, dão origem, somente, a tipos celulares específicos.

QUESTÃO 20-10

Qual das seguintes substâncias você espera que se espalhe de uma célula à outra através da (a) junção tipo fenda e do (b) plasmodesmo: ácido glutâmico, mRNA, AMP cíclico, Ca^{2+}, proteínas G e fosfolipídeos da membrana plasmática?

QUESTÃO 20-11

Discuta a seguinte afirmativa: "Se uma célula vegetal tivesse filamentos intermediários para fornecer a força elástica à célula, sua parede celular seria dispensável?".

QUESTÃO 20-12

Por meio da troca de pequenos metabólitos e íons, as junções tipo fenda proporcionam uma ligação metabólica e elétrica entre as células. Por que você acha que os neurônios se comunicam por sinapses e não pelas junções tipo fenda?

QUESTÃO 20-13

A gelatina é constituída basicamente de colágeno, o qual é responsável pela marcante força elástica do tecido conectivo. Esse é o ingrediente básico da gelatina. Como você deve ter percebido muitas vezes, quando você está comendo gelatina com sabor de morango, a gelatina não apresenta muita força elástica. Por quê?

QUESTÃO 20-14

"A estrutura de um organismo é determinada pelo genoma que o ovo contém". Qual é a evidência na qual essa afirmativa se baseia? Um amigo lhe desafia e sugere que você substitua o DNA do ovo de uma cegonha com DNA humano para ver se nasce um bebê humano. Como você responderia?

QUESTÃO 20-15

A leucemia, isto é, um câncer que surge da produção excessiva de células sanguíneas brancas, apresenta um surgimento mais precoce do que outros tipos de câncer. Proponha uma explicação para isso.

QUESTÃO 20-16

Considere cuidadosamente o gráfico da **Figura Q20-16**, que mostra os casos de câncer de colo diagnosticado a cada 100.000 mulheres por ano em função da idade. Por que a curva deste gráfico é tão abrupta e repentina, se as mutações ocorrem a uma frequência similar durante a vida de uma pessoa?

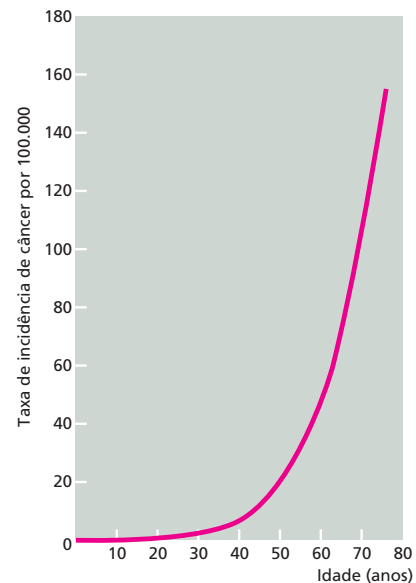



Figura Q20-16

QUESTÃO 20-17

Pessoas que fumam grande quantidade de cigarros ou trabalhadores industriais expostos por um tempo limitado a carcinogênicos químicos que induzem mutação no DNA normalmente não iniciam o desenvolvimento de câncer característico de seu hábito ou ocupação até 10, 20 ou mais anos após a exposição. Sugira uma explicação para esse longo atraso.

QUESTÃO 20-18

Altos níveis do hormônio sexual feminino, estrogênio, aumentam a incidência de algumas formas de câncer. Assim, alguns tipos de anticoncepcionais mais antigos que continham altas concentrações de estrogênio foram banidos porque aumentavam o risco de câncer do revestimento uterino. Machos transexuais que usam preparações de estrogênio para terem uma aparência feminina possuem um risco aumentado de câncer de mama. Altos níveis de androgênios (hormônio sexual masculino) aumentam o risco de algumas outras formas de câncer, como o câncer de próstata. Pode-se deduzir que o estrogênio e o androgênio são mutagênicos?

QUESTÃO 20-19

O câncer é hereditário?

Respostas

CAPÍTULO 1

RESPOSTA 1-1 A tentativa de definir vida em termos de propriedades é uma tarefa ilusória, como sugerido por esse exercício de pontuação (**Tabela R1-1**). Aspiradores de pó são objetos bastante organizados, tomam matéria e energia do meio e transformam a energia em movimento respondendo ao estímulo do operador assim que solicitados. Por outro lado, eles não podem se reproduzir ou crescer nem se desenvolver – mas os animais velhos também não podem. Batatas não são particularmente responsivas a estímulos, e assim por diante. É curioso que as definições-padrão de vida normalmente não mencionam que os organismos vivos sobre a Terra são basicamente feitos de moléculas orgânicas nem que a vida se baseia em carbono. Como sabemos, os tipos-chave de "macromoléculas de informação" – DNA, RNA e proteína – são os mesmos para cada espécie viva.

TABELA R1-1 Pontuações de "vida" plausíveis para um aspirador de pó, uma batata e um humano

Características	Aspirador de pó	Batata	Humano
1. Organização	Sim	Sim	Sim
2. Homeostase	Sim	Sim	Sim
3. Reprodução	Não	Sim	Sim
4. Desenvolvimento	Não	Sim	Sim
5. Energia	Sim	Sim	Sim
6. Responsividade	Sim	Não	Sim
7. Adaptação	Não	Sim	Sim

RESPOSTA 1-2 A maioria das alterações ao acaso no modelo de um sapato resultaria em defeitos repreensíveis: sapatos com múltiplos saltos, sem sola ou com tamanhos inadequados obviamente não seriam vendidos e, portanto, seriam selecionados novamente pelas forças do mercado. Outras alterações seriam neutras, como pequenas variações na cor ou no tamanho. Uma minoria de alterações, entretanto, poderia resultar em sapatos mais desejáveis: ranhuras profundas em uma sola anteriormente lisa, por exemplo, criariam sapatos que se comportariam melhor em condições úmidas; a perda dos saltos altos poderia produzir sapatos mais confortáveis. O exemplo ilustra que alterações ao acaso podem levar a melhoras significativas se o número de tentativas for grande o bastante e pressões seletivas forem impostas.

RESPOSTA 1-3 É extremamente improvável que você tenha criado um novo organismo nesse experimento. É muito mais provável que um esporo do ar tenha caído no seu meio, germinado e dado origem às células que você observou. Na metade do século XIX, Louis Pasteur inventou um aparelho inteligente para contestar a crença, então amplamente aceita, de que a vida poderia aparecer espontaneamente. Ele demonstrou que frascos selados nunca germinaram qualquer coisa se esterilizados primeiro por calor. Ele superou as objeções daqueles que apontaram a falta de oxigênio, ou daqueles que sugeriram que essa esterilização por calor mataria o princípio gerador de vida, utilizando um frasco especial com um delgado "pescoço de cisne", que foi desenvolvido para prevenir que os esporos do ar contaminassem a cultura (**Figura R1-3**). As culturas nesses frascos nunca mostraram qualquer sinal de vida; entretanto, eles eram capazes de suportar vida, como pode ser demonstrado pela lavagem da "poeira" a partir do pescoço para dentro da cultura.

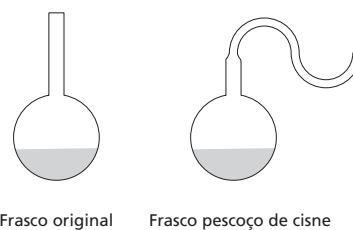



Figura R1-3

RESPOSTA 1-4 6×10^{39} (= 6×10^{27} g/10^{-12} g) de Bacteria teriam a mesma massa que a Terra. E $6 \times 10^{39} = 2^{t/20}$, de acordo com a equação que descreve o crescimento exponencial. A resolução dessa equação para t resulta em $t = 2.642$ minutos (ou 44 horas). Isso representa apenas 132 tempos de geração (!), e 5×10^{14} tempos de geração bacteriana se passaram durante os últimos 3,5 bilhões de anos. Obviamente, a massa total de Bacteria sobre esse planeta em nenhum lugar está próxima à massa da Terra. Isso ilustra que o crescimento exponencial pode ocorrer apenas durante pouquíssimas gerações, isto é, por diminutos períodos de tempo comparados com a evolução. Em qualquer cenário realístico, o fornecimento de alimento se torna limitante muito rapidamente.

Esse cálculo simples nos mostra que a capacidade para crescer e dividir-se rapidamente, quando o alimento é abundante, é apenas um fator na sobrevivência de uma espécie. O alimento geralmente é escasso, e indivíduos da mesma espécie têm de competir um com o outro pelas fontes limitadas. A seleção natural favorece mutantes que vencem a competição ou que encontram meios de explorar fontes de alimento que os seus vizinhos são incapazes de utilizar.

RESPOSTA 1-5 Ver **Figura R1-5**

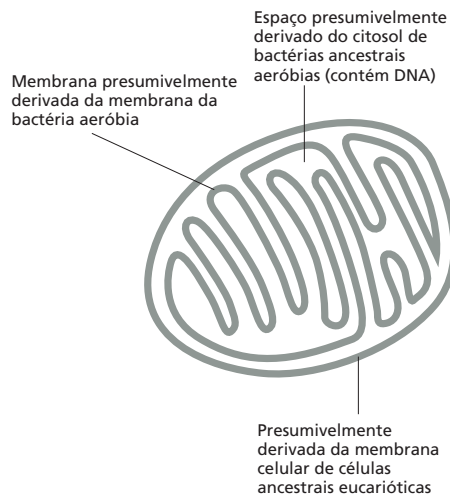



Figura R1-5

RESPOSTA 1-6 Pelo engolfamento de substâncias, como partículas de alimento, as células eucarióticas podem sequestrá-las para se alimentar eficientemente. Bacteria, ao contrário, não têm como capturar massas de alimento; elas podem exportar substâncias que ajudam a quebrar as substâncias do alimento no meio, mas os produtos desse trabalho devem, então, ser compartilhados com outras células na mesma vizinhança.

RESPOSTA 1-7 A microscopia óptica é muito mais fácil de ser utilizada e requer instrumentos muito mais simples. Objetos que têm 1 μm de tamanho podem ser facilmente resolvidos; o menor limite de resolução é de 0,2 μm, que é um limite teórico imposto pelo comprimento de onda da luz visível. A luz visível não é destrutiva e passa prontamente através da água, tornando possível observar células vivas. A microscopia eletrônica, por outro lado, é muito mais complicada, tanto na preparação da amostra (que necessita ser cortada muito fina, corada com metal pesado elétron-denso e completamente desidratada) como na natureza do instrumento. As células vivas não podem ser observadas em um microscópio eletrônico. No entanto, a resolução da microscopia eletrônica é muito mais alta, e objetos tão pequenos quanto 10 nm podem ser facilmente resolvidos. Para observar qualquer detalhe estrutural, microtúbulos, mitocôndrias e bactérias deveriam ser analisadas por microscopia eletrônica. No entanto, é possível corá-los com corantes específicos e então determinar a sua localização por microscopia óptica.

RESPOSTA 1-8 Como as operações básicas das células são tão similares, muitas foram compreendidas a partir de estudos em sistemas-modelo. A levedura de cervejaria é um bom sistema-modelo porque as células de levedura são muito mais simples do que as células humanas de câncer. Podemos cultivar leveduras com baixos custos e em vastas quantidades e podemos manipular células de levedura genética e bioquimicamente com muito mais facilidade do que as células humanas. Isso nos permite utilizar leveduras para decifrar as regras básicas que governam como as células se dividem e crescem. Células cancerosas se dividem quando não deveriam (e por isso dão origem a tumores), e uma compreensão básica de como a divisão celular é controlada é, portanto, relevante quanto ao problema do câncer. O National Cancer Institute, a American Cancer Society e várias outras instituições que se dedicam a encontrar uma cura para o câncer amparam fortemente a pesquisa básica em vários aspectos da divisão celular em diferentes sistemas-modelo, como leveduras.

RESPOSTA 1-9 Confira as suas respostas utilizando o Glossário e o Painel 1-2 (p. 25).

RESPOSTA 1-10

A. Incorreta. A informação hereditária está codificada no DNA da célula, que, por sua vez, codifica para as proteínas.
B. Correta. Bactérias não possuem um núcleo.
C. Incorreta. As plantas são compostas de células eucarióticas que contêm cloroplastos como organelas citoplasmáticas. Acredita-se que os cloroplastos tenham derivado evolutivamente a partir de células procarióticas.
D. Correta. O número de cromossomos varia de um organismo para outro, mas é constante em todas as células do mesmo organismo.
E. Incorreta. O citosol é o citoplasma excluindo todas as organelas.
F. Correta. O envelope nuclear é uma membrana dupla, e as mitocôndrias estão envoltas tanto por uma membrana interna como por uma externa.
G. Incorreta. Os protozoários são organismos unicelulares e por isso não têm tecidos diferentes. Entretanto, eles têm uma estrutura complexa com partes altamente especializadas.
H. Relativamente certa. Peroxissomos e lisossomos contêm enzimas que catalisam a quebra de substâncias produzidas no citosol ou captadas pela célula. Entretanto, pode-se argumentar que várias dessas substâncias são degradadas para gerar moléculas de alimento e como tais certamente não são "indesejáveis".

RESPOSTA 1-11 Um cérebro pesa em média 10^{-9} g (= 1.000 g/10^{12}). Como 1 g de água ocupa 1 mL = 1 cm^3 (= 10^{-6} m^3), o volume de uma célula é 10^{-15} m^3 (= 10^{-9} g × 10^{-6} m^3/g). Considerando que a raiz cúbica origina um comprimento lateral de 10^{-5} m ou 10 μm (10^6 μm = 1 m) para cada célula. A página do livro tem uma superfície de 0,057 m^2 (= 21 cm × 27,5 cm). Consequentemente, 57 × 10^7 (= 0,057 m^2/10^{-10} m^2) células se encaixam nesta página quando espalhadas como uma única camada. Dessa forma, 10^{12} células iriam ocupar 1.750 páginas (= 10^{12}/[57 × 10^7]).

RESPOSTA 1-12 Nessa célula vegetal, A é o núcleo, B é o vacúolo, C é a parede celular, e D é um cloroplasto. A barra de escala representa cerca de 10 μm, a largura do núcleo.

RESPOSTA 1-13 Os três principais filamentos são os filamentos de actina, os filamentos intermediários e os microtúbulos. Os filamentos de actina estão envolvidos no movimento celular rápido, como contração de uma célula muscular; os filamentos intermediários fornecem estabilidade mecânica, como nas células epidermais da pele, e os microtúbulos funcionam como "trilhos de uma estrada de ferro" para os movimentos intracelulares e

são responsáveis pela separação dos cromossomos durante a divisão celular. Outras funções de todos esses filamentos são discutidas no Capítulo 17.

RESPOSTA 1-14 As células mutantes levam apenas 20 horas, isto é, menos de um dia para se tornarem mais abundantes na cultura. Utilizando a equação fornecida na questão, vimos que o número das células bacterianas originais ("tipo selvagem") no tempo *t* minutos, depois que a mutação ocorreu, é de $10^6 \times 2^{t/20}$. O número de células mutantes no tempo *t* é de $1 \times 2^{t/15}$. Para descobrir quando as células mutantes "alcançam" as células do tipo selvagem, simplesmente temos de igualar esses dois números entre si (isto é, $10^6 \times 2^{t/20} = 2^{t/15}$). Tomando o logaritmo para base 10 em ambos os lados dessa equação e resolvendo-a para *t* resulta em $t = 1.200$ minutos (ou 20 horas). Nesse momento, a cultura contém 2×10^{24} células ($10^6 \times 2^{60}$ + 1×2^{80}). Consequentemente, 2×10^{24} células bacterianas, cada uma pesando 10^{-12} g, iriam pesar 2×10^{12} g (= 2×10^9 kg ou 2 milhões de toneladas!). Esse somente pode ter sido um experimento imaginado.

RESPOSTA 1-15 As bactérias continuamente adquirem mutações no seu DNA. Na população de células expostas ao agente tóxico, uma ou algumas células podem adquirir uma mutação que as tornam resistentes à ação da droga. Antibióticos que são tóxicos para bactérias, por se ligarem a certas proteínas bacterianas, por exemplo, não funcionariam se a proteína tivesse uma superfície levemente alterada de modo que a ligação ocorresse mais fracamente ou não ocorresse. Essa bactéria mutante continuaria a se dividir rapidamente enquanto seus parentes cresceriam devagar. A bactéria resistente ao antibiótico logo se tornaria a espécie predominante na cultura.

RESPOSTA 1-16 $10^{13} = 2^{(t/1)}$. Portanto, levaria apenas 43 dias *(t* = 13/log(2)]. Isso explica por que alguns cânceres podem progredir rapidamente. Entretanto, várias células cancerosas se dividem muito mais lentamente ou morrem por causa das suas anormalidades internas ou porque elas não têm suprimento de sangue suficiente; por isso, a progressão atual do câncer é normalmente mais lenta.

RESPOSTA 1-17 Células vivas se desenvolveram a partir de matéria não viva, mas cresceram e replicaram. Da mesma forma como o material do qual elas originaram, elas são governadas pelas leis da física, da termodinâmica e da química. Dessa forma, por exemplo, elas não podem criar energia *de novo* ou montar estruturas ordenadas sem o gasto de energia livre. Podemos compreender praticamente todos os eventos celulares, como metabolismo, catálise, montagem da membrana e replicação de DNA, assim como reações químicas complicadas que podem ser reproduzidas experimentalmente, manipuladas e estudadas em tubos de ensaio.

Apesar dessa redutibilidade fundamental, uma célula viva é mais do que a soma das suas partes. Não podemos misturar proteínas, ácidos nucleicos e outros compostos aleatoriamente em um tubo de ensaio, por exemplo, e fazer uma célula. A célula funciona em virtude da sua estrutura organizada, e isso é um produto da sua história evolutiva. As células sempre se originam a partir de células preexistentes, e a divisão da célula-mãe passa tanto os constituintes químicos como as estruturas para as suas filhas. A membrana plasmática, por exemplo, nunca tem de se formar *de novo,* mas cresce pela expansão de uma membrana preexistente; sempre existirá um ribossomo, em parte feito de proteínas, cuja função é sintetizar mais proteínas incluindo aquelas que fazem mais ribossomos.

RESPOSTA 1-18 Em um organismo multicelular, diferentes células assumem funções especializadas e cooperam umas com as outras. Desse modo, organismos multicelulares são capazes de explorar fontes de alimento que são inacessíveis para organismos unicelulares. Uma planta, por exemplo, pode alcançar o solo com as suas raízes para captar água e nutrientes e ao mesmo tempo captar energia solar e CO_2 a partir do ar pelas suas folhas. Protegendo as suas células reprodutoras com outras células especializadas, o organismo multicelular pode desenvolver novos meios para sobreviver em meio hostil ou para repelir predadores. Quando o alimento esgota, elas devem ser capazes de preservar as suas células reprodutoras, permitindo que elas saquem recursos estocados por suas companheiras – ou até mesmo canibalizar parentes (um processo comum, na verdade).

RESPOSTA 1-19 O volume e a área de superfície são $5,24 \times 10^{-19}$ m^3 e $3,14 \times 10^{-12}$ m^2 para a célula bacteriana e $1,77 \times 10^{-15}$ m^3 e $7,07 \times 10^{-10}$ m^2 para a célula animal, respectivamente. A partir desses números, as proporções entre superfície e volume são de 6×10^6 m^{-1} e 4×10^5 m^{-1}, respectivamente. Em outras palavras, embora a célula animal tenha um volume 3.375 vezes maior, a sua superfície de membrana está aumentada apenas 225 vezes. No entanto, se as membranas internas forem incluídas no cálculo, as relações entre superfície e volume de ambas as células são aproximadamente iguais. Dessa forma, por causa das suas membranas internas, as células eucarióticas podem crescer em tamanho e ainda manter uma área suficientemente grande de membrana, que – como discutiremos com maiores detalhes nos capítulos posteriores – é necessária para várias funções essenciais.

RESPOSTA 1-20 Existem várias linhas que evidenciam a existência de um ancestral comum. A análise de células vivas nos dias de hoje mostra um surpreendente grau de similaridade nos componentes básicos que formam as operações internas do vasto mundo diferente de células. Várias vias metabólicas, por exemplo, são conservadas de uma célula para outra, e os compostos que compõem os ácidos nucleicos e proteínas são os mesmos em todas as células vivas. Ainda assim é fácil imaginar que uma escolha diferente de compostos (p. ex., aminoácidos com diferentes cadeias laterais) teria funcionado da mesma maneira. Similarmente, não é incomum observar que proteínas importantes têm uma estrutura detalhada muito similar em células procarióticas e eucarióticas. Teoricamente, haveria várias vias diferentes para sintetizar proteínas que poderiam realizar as mesmas funções. Evidências claras mostram que a maioria dos processos foi "inventada" apenas uma vez e então refinada durante a evolução para se ajustar às necessidades particulares das células especializadas.

No entanto, parece bastante improvável que a primeira célula tenha sobrevivido para se tornar a célula primordial fundadora do mundo vivo atual. Como a evolução não é um processo direto com uma progressão intencional, é mais provável que tenha existido um vasto número de células experimentais malsucedidas que replicaram durante um tempo e então se extinguiram porque não puderam se adaptar às alterações no meio, ou não puderam sobreviver em competições com outros tipos de células. Podemos, então, especular que a célula ancestral primordial foi uma célula "sortuda" que acabou em um meio relativamente estável no qual ela teve uma chance para replicar e se desenvolver.

RESPOSTA 1-21 Ver **Figura R1-21**

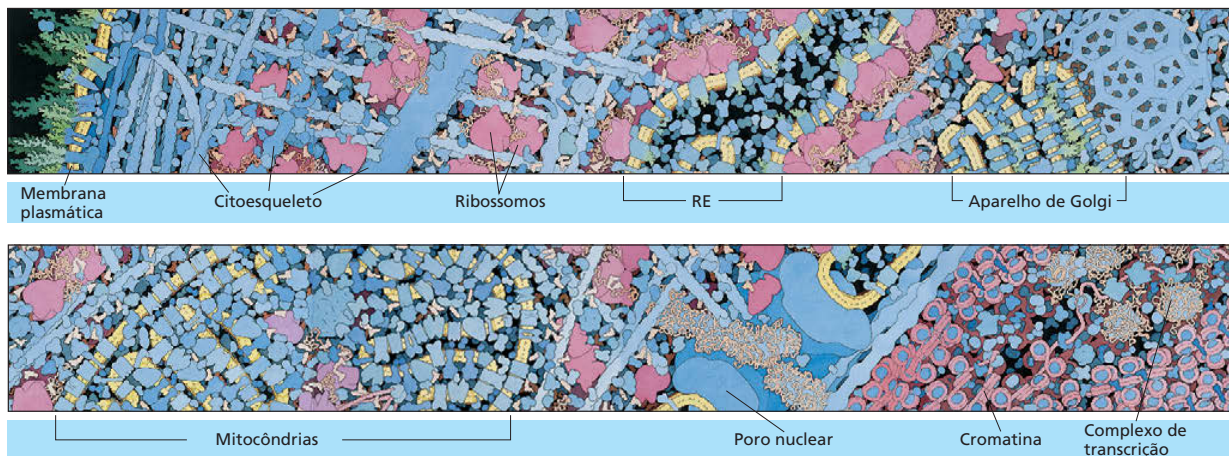



Figura R1-21 Cortesia de D. Goodsell.

RESPOSTA 1-22 Uma inspeção rápida poderá revelar cílios na superfície da célula; a sua presença confirmaria que a célula é um eucarioto. Se você não os observar, terá de procurar por outras características para distinção. Se você tiver sorte, poderá ver a célula dividir-se. Observe-a então com as lentes corretas, você poderá ser capaz de ver cromossomos mitóticos condensados, que de novo lhe confirmaria que a célula é eucariótica. Fixe a célula e a core com um corante para DNA: se esse estiver contido dentro de um núcleo, a célula é um eucarioto; se você não conseguir visualizar um núcleo bem definido, a célula poderá ser um procarioto. De forma alternativa, core a célula com um corante que se ligue à actina ou tubulina (proteínas que são bastante conservadas nos eucariotos, mas ausentes em bactérias). Embeba-a, corte-a e observe-a com um microscópio eletrônico: você pode ver organelas como mitocôndrias dentro da sua célula? Tente corá-la com o corante de Gram, que é específico para moléculas na parede celular de algumas classes de bactérias. Contudo, todos esses testes podem falhar, deixando você ainda com dúvida. Para uma resposta definitiva você poderia tentar analisar as sequências das moléculas de DNA e RNA que ela contém, usando os sofisticados métodos descritos mais adiante neste livro. As sequências de moléculas bastante conservadas, como aquelas que formam os componentes centrais dos ribossomos, fornecem uma assinatura molecular que pode lhe informar se a sua célula é um Eukarya, uma Bacteria ou uma Archaea. Se você não for capaz de detectar qualquer RNA, você provavelmente não está observando uma célula, mas sim um pedaço de sujeira.

CAPÍTULO 2

RESPOSTA 2-1 As chances são excelentes em virtude da enormidade do número de Avogrado. A xícara original contém um mol de água, ou 6×10^{23} moléculas, e o volume dos oceanos da Terra, convertido para centímetros cúbicos, é de $1{,}5 \times 10^{24}$ cm^3. Depois de misturada, há uma média de 0,4 moléculas de água "grega" por cm^3 ($6 \times 10^{23}/1{,}5 \times 10^{24}$), ou 7,2 moléculas em 18 g do Oceano Pacífico.

RESPOSTA 2-2

A. O número atômico é 6; o peso atômico é 12 (= 6 prótons e 6 nêutrons).
B. O número de elétrons é seis (= o número de prótons).
C. A primeira camada pode acomodar dois elétrons, e a segunda camada, oito elétrons. O carbono, portanto, necessita de quatro elétrons adicionais (ou poderia doar quatro elétrons) para completar a sua camada mais externa. O carbono é mais estável quando compartilha quatro elétrons adicionais com outros átomos (inclusive átomos de carbono), formando quatro ligações covalentes.
D. O carbono 14 tem dois elétrons a mais no núcleo. Uma vez que as propriedades químicas e um átomo são determinadas pelos seus elétrons, o carbono 14 é quimicamente idêntico ao carbono 12.

RESPOSTA 2-3 A afirmação está correta. Tanto a ligação iônica quanto a ligação covalente se baseiam nos mesmos princípios: elétrons podem ser compartilhados igualmente entre dois átomos que estejam interagindo, formando uma ligação covalente não polar; elétrons podem ser compartilhados desigualmente entre dois átomos, formando uma ligação covalente polar; ou elétrons podem ser completamente perdidos por um átomo e recebidos por outro átomo, formando uma ligação iônica. Existem ligações para cada estado intermediário que possa ser concebido, e, nos casos limítrofes, é arbitrário descrever uma ligação como sendo uma ligação muito polar ou uma ligação iônica.

RESPOSTA 2-4 A afirmação está correta. A ligação hidrogênio-oxigênio das moléculas de água é polar, de modo que os átomos de oxigênio carregam mais carga negativa do que os átomos de hidrogênio. Essas cargas negativas parciais são atraídas pelos íons sódio carregados positivamente, mas são repelidas pelos íons cloreto carregados negativamente.

RESPOSTA 2-5

A. O íon hidrônio (H_3O^+) é resultante da dissociação da água em prótons e íons hidroxila. Cada próton se liga a uma molécula de água formando um íon hidrônio ($2H_2O \rightarrow H_2O + H^+ + OH^- \rightarrow H_3O^+ + OH^-$). Em pH neutro, isto é, na ausência de qualquer ácido que forneça mais íons H_3O^+ ou de base que forneça mais íons OH^-, as concentrações de íons H_3O^+ e OH^- são iguais. Sabe-se que, na neutralidade, o pH = 7,0 e, portanto, a concentração H^+ é 10^{-7} M. A concentração de H^+ se iguala à concentração de $H3O^+$.

B. Para calcular a relação entre íons H_3O^+ e moléculas de H_2O, necessita-se saber a concentração das moléculas de água. O peso molecular da água é 18 (isto é, 18 g/mol), e um litro de água pesa 1 kg. Portanto, a concentração de água é 55,6 M (=1.000 [g/L]/[18 g/mol], e a relação de íons H_3O^+ para moléculas de H_2O é de $1{,}8 \times 10^{-9}$ ($=10^{-7}/55{,}6$), isto é, apenas duas moléculas de água em um bilhão estão dissociadas em pH neutro.

RESPOSTA 2-6 Nenhum engano. Observe que os átomos de hidrogênio pequenos são aqueles que estão ligados a um átomo de oxigênio, ao passo que os que estão ligados a átomos de carbono são maiores. Isso reflete a polaridade das respectivas ligações: a ligação H-C é apolar, e a ligação H-O é polar. O oxigênio puxa mais fortemente os elétrons compartilhados, resultando em uma nuvem eletrônica de menor raio no átomo de hidrogênio.

RESPOSTA 2-7 A síntese de uma macromolécula com uma estrutura única necessita que em cada posição apenas um esteroisômero seja usado. Mudando um aminoácido da forma L– para a sua forma D– resultaria em uma proteína diferente. Então, se na construção de uma proteína, para cada aminoácido fosse utilizada uma mistura aleatória de formas D– e L–, a sequência de aminoácidos não especificaria uma única estrutura, mas muitas estruturas diferentes (seriam formadas 2^N estruturas diferentes, sendo que N é o número de aminoácidos da proteína).

O motivo pelo qual os L-aminoácidos foram selecionados na evolução como os blocos exclusivos para formar proteínas é um mistério. Pode-se imaginar uma célula na qual certos aminoácidos (ou mesmo todos) fossem usados na forma D– para formar proteínas, desde que esses esteroisômeros fossem usados exclusivamente.

RESPOSTA 2-8 O termo "polaridade" pode ser usado com dois significados diferentes. Em um deles, refere-se à assimetria de direcionalidade, por exemplo, nos polímeros lineares, como os polipeptídeos, que possuem um N-terminal e um C-terminal, ou os ácidos nucleicos, que têm extremidades 3′ e 5′. Como nos polipeptídeos, as ligações se formam apenas entre os grupos amino e carboxila dos aminoácidos e, nos ácidos nucleicos, entre as extremidades 3′ e 5′, os ácidos nucleicos e os polipeptídeos sempre têm duas extremidades diferentes, que dão às cadeias uma polaridade definida.

No outro sentido, polaridade se refere a uma separação da carga elétrica em uma ligação ou molécula. Esse tipo de polaridade permite pontes de hidrogênio e, como a solubilidade em água, ou hidrofilicidade, de uma molécula depende de ela ser polar nesse sentido, o termo "polar" algumas vezes é usado para indicar a solubilidade em água.

RESPOSTA 2-9 A principal vantagem das reações de condensação é que elas são facilmente revertidas por hidrólise (ainda mais que a água está prontamente disponível nas células). Isso permite que as células degradem suas macromoléculas (ou macromoléculas de organismos que tenham ingerido como alimento) e recuperem as subunidades intactas de modo que elas possam ser "recicladas", isto é, usadas para formar novas macromoléculas.

RESPOSTA 2-10 Muitas das funções que as macromoléculas realizam se baseiam na capacidade que elas têm em se associarem e se dissociarem rapidamente. Isso permite que as células, por exemplo, remodelem o seu interior quando se movem ou se dividem e transportem componentes de uma a outra organela. As ligações covalentes podem ser fortes e permanentes o suficiente para isso.

RESPOSTA 2-11

A. Verdadeiro. Todo o núcleo é feito de prótons carregados positivamente e nêutrons não carregados. A única exceção é o núcleo de hidrogênio, que consiste em apenas um próton.
B. Falso. Os átomos são eletricamente neutros. O número de prótons carregados positivamente é sempre equilibrado por um número igual de elétrons negativamente carregados.
C. Verdadeiro, mas somente para o núcleo das células (ver Capítulo 1), e não para o núcleo atômico discutido neste capítulo.
D. Falso. Os elementos podem ter diferentes isótopos, que diferem apenas no número de seus nêutrons.
E. Verdadeiro. Em certos isótopos, o grande número de nêutrons desestabiliza o núcleo, que se decompõe em um processo denominado decaimento radioativo.
F. Verdadeiro. Os exemplos incluem grânulos de glicogênio, um polímero de glicose encontrado nas células do fígado, e gotículas de gordura, feitas de agregados de triacilgliceróis, encontradas nas células adiposas.
G. Verdadeiro. Individualmente, essas ligações são fracas e facilmente rompidas pela energia cinética, mas, uma vez que interações entre duas macromoléculas envolvem um grande número dessas ligações, a ligação total pode ser forte, e, como as ligações de hidrogênio se formam apenas entre grupos posicionados corretamente nas moléculas que interagem, elas são muito específicas.

RESPOSTA 2-12

A. Uma molécula de celulose tem um peso molecular de $n \times$ (12[C] + 2 × 1[H] + 1 [O]). Não se conhece n, mas pode-se determinar a proporção com que cada elemento individual contribui para o peso da celulose. A contribuição dos átomos de carbono é de 40% [=12/(12 + 2 + 16) × 100%]. Consequentemente, 2 g (40% de 5 g) de átomos de carbono estão contidos na celulose que faz esta página. O peso atômico do carbono é 12 g/mol, mas existem 6×10^{23} átomos ou moléculas em um mol. Por isso, 10^{23} átomos de carbono (= 2 g /2 [g/mol]) × 6×10^{23} (moléculas/mol) formam esta página.
B. O volume desta página é de 4×10^{-6} m^3 (= 21 cm × 27,5 cm × 0,07 mm), o que corresponde a um cubo com lados de 1,6 cm ($= \sqrt[3]{4 \times 10^{-6}}$ m^3). Uma vez que, da parte A da questão, sabe-se que a página contém 10^{23} átomos de carbono, a geometria nos diz que há cerca de $4{,}6 \times 10^7$ átomos de carbono ($= \sqrt[3]{10^{23}}$) alinhados ao longo de cada lado desse cubo. Portanto, cerca de 200.000 átomos de carbono ($4{,}6 \times 10^7 \times 0{,}07 \times 10^{-3}$ m$/1{,}6 \times 10^{-2}$ m) estão atravessando a espessura desta página.
C. Se empilhados bem apertados, 350.000 átomos de carbono com 0,2 nm de diâmetro perfazem os 0,07 mm da espessura desta página.
D. A diferença de 1,7 vez nos dois cálculos reflete (1) que o carbono não é o único átomo na celulose e (2) que o papel não é uma treliça atômica de moléculas dispostas em uma organização precisa (assim como o diamante, o papel poderia ter um arranjo preciso de átomos de carbono), mas uma malha de fibras com muitos espaços vazios.

RESPOSTA 2-13

A. A ocupação dos três níveis eletrônicos mais internos é 2, 8, 8.

B. hélio — já tem o nível completo
   oxigênio — ganha 2
   carbono — ganha 4 ou perde 4
   sódio — perde 1
   cloro — ganha 1

C. O hélio com seu nível eletrônico totalmente ocupado é quimicamente não reativo. O sódio e o cloro, por outro lado, são extremamente reativos e facilmente formam íons Na^+ e Cl^- estáveis, como no sal de cozinha.

RESPOSTA 2-14 O átomo de enxofre é muito maior do que o átomo de oxigênio e, em virtude desse tamanho maior, os elétrons mais externos não são atraídos tão fortemente pelo núcleo do átomo de enxofre como ocorre no átomo de oxigênio. Consequentemente, a ligação hidrogênio-enxofre é muito menos polar do que a ligação hidrogênio-oxigênio. Em virtude da reduzida polaridade, o enxofre, nas moléculas de H_2S, não atrai tão fortemente os átomos de hidrogênio das moléculas de H_2S adjacentes, de modo que não há formação de ligações de hidrogênio, que são proeminentes na água.

RESPOSTA 2-15 O diagrama das reações está na Figura R2-15, onde R_1 e R_2 são cadeias laterais de aminoácidos.

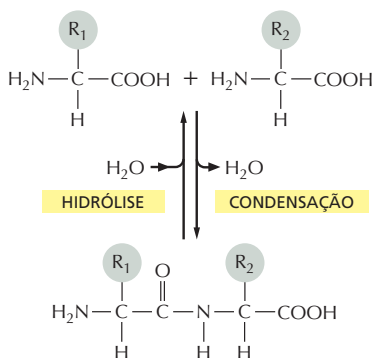



Figura R2-15

RESPOSTA 2-16

A. Falso. As propriedades das proteínas dependem tanto dos aminoácidos que elas contêm quanto da ordem na qual eles estão unidos. A diversidade das proteínas se deve ao número praticamente ilimitado de maneiras pelas quais os 20 diferentes aminoácidos podem combinar-se em sequências lineares.
B. Falso. Os lipídeos se organizam em bicamadas através de forças não covalentes. Uma membrana, portanto, não é uma macromolécula.
C. Verdadeiro. O esqueleto dos ácidos nucleicos é feito por riboses (ou desoxirribose no DNA) e grupos fosfato alternadamente. A ribose e a desoxirribose são açúcares.
D. Verdadeiro. Cerca da metade dos 20 aminoácidos de ocorrência natural têm cadeias laterais hidrofóbicas. Nas proteínas já enoveladas, muitas dessas cadeias laterais estão voltadas para o interior da molécula, pois elas são repelidas pela água.
E. Verdadeiro. As caudas hidrocarbonadas hidrofóbicas contêm apenas ligações não polares. Assim, elas não podem participar de ligações de hidrogênio e são repelidas pela água. Os princípios que regem esse fenômeno estão mais detalhados no Capítulo 11.
F. Falso. O RNA contém as quatro bases listadas, mas o DNA contém T no lugar de U. T e U são muito semelhantes, diferindo apenas por um grupo metila.

RESPOSTA 2-17

A. (a) 400 ($=20^2$); (b) 8.000 ($=20^3$); (c) 160.000 ($=20^4$).
B. Uma proteína com um peso molecular de 4.800 dáltons é formada por cerca de 40 aminoácidos. Portanto, existem $1{,}1 \times 10^{52}$ ($=20^{40}$) maneiras diferentes de fazer essa proteína. Cada proteína, individualmente, pesa 8×10^{-21} g (4.800/6 × 10^{23}); portanto, uma mistura contendo uma de cada, uma das moléculas possíveis pesa 9×10^{31} g ($= 8 \times 10^{-21}$ g x 1,1 × 10^{52}), que é 15.000 vezes a massa total do planeta Terra, que pesa 6×10^{24} kg. De fato, seria preciso um recipiente realmente grande.
C. Uma vez que a maioria das proteínas presentes na célula é maior do que a proteína usada nesse exemplo, é evidente que apenas uma fração muito pequena das possíveis sequências de aminoácidos é usada pelas células.

RESPOSTA 2-18 Como todas as células vivas são feitas de substâncias químicas e como todas as reações químicas (indiferentemente se em uma célula viva ou em um tubo de ensaio) seguem as mesmas regras, a compreensão dos princípios químicos básicos é fundamental para entender a biologia. No correr deste livro, haverá, frequentemente, retomada desses princípios sobre os quais se baseiam todas as vias e reações muito complicadas que ocorrem nas células.

RESPOSTA 2-19

A. Ligações de hidrogênio necessitam de grupos específicos para interagirem: um átomo de hidrogênio ligado por uma ligação polar a um átomo de oxigênio ou nitrogênio e, normalmente, um átomo de oxigênio ou nitrogênio. As atrações de van der Waals são mais fracas e ocorrem entre dois átomos que estejam próximos o suficiente. Tanto as ligações de hidrogênio quanto as atrações de van der Waals são interações de curta distância que passam a existir quando as duas moléculas já estão próximas. Ambos os tipos de ligações, portanto, podem ser consideradas como sendo o ajuste fino de uma interação, isto é, auxiliando a posicionar corretamente duas moléculas, uma em relação à outra, depois que elas tenham sido aproximadas pela difusão.
B. Nos três exemplos, podem formar-se atrações de van der Waals. Ligações de hidrogênio podem formar-se apenas em (c).

RESPOSTA 2-20 Interações não covalentes são formadas entre as subunidades de macromoléculas, isto é, entre cadeias laterais dos aminoácidos de uma cadeia polipeptídica, fazendo com que a cadeia polipeptídica assuma uma forma única. Essas interações incluem ligações de hidrogênio, interações iônicas, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas. Por serem fracas, essas interações podem ser rompidas com relativa facilidade de modo que a maioria das macromoléculas pode ser desenovelada pelo aquecimento, que aumenta a energia térmica.

RESPOSTA 2-21 Moléculas anfipáticas têm tanto uma porção hidrofílica como uma porção hidrofóbica. As porções hidrofílicas podem formar ligações de hidrogênio com a água, mas a porção hidrofóbica é repelida pela água porque ela interfere na estrutura da água. Consequentemente, as porções hidrofóbicas das moléculas anfipáticas tendem a ficar expostas ao ar, na interface ar-líquido, ou agregarem-se (ver **Figura R2-21**).

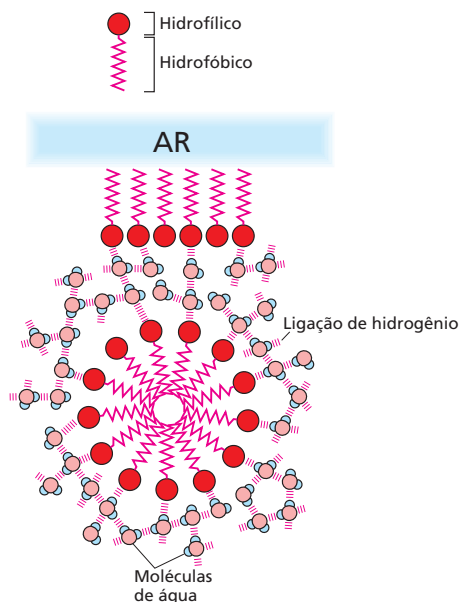



Figura R2-21

RESPOSTA 2-22

A,B. Tanto (A) como (B) são fórmulas corretas do aminoácido fenilalanina. Na forma (B), a fenilalanina está mostrada na forma ionizada que existe em soluções aquosas, em que o grupo amino (básico) está protonado, e o grupo carboxílico (ácido), desprotonado.

C. Incorreta. Nessa estrutura de ligação peptídica, está faltando o átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio.

D. Incorreta. Nessa fórmula, a base adenina contém ligações duplas a mais, criando um átomo de carbono com cinco valências e um átomo de nitrogênio com quatro.

E. Incorreta. O trifosfato de nucleosídeo deveria ter dois átomos de oxigênio a mais, um entre cada um dos átomos de fósforo.

F. Essa é a fórmula correta do etanol.

G. Incorreta. A água não forma ligações de hidrogênio com hidrogênios que estejam ligados a átomos de carbono. Essa falta de capacidade de formar ligações de hidrogênio torna as cadeias hidrocarbonadas hidrofóbicas, isto é, com aversão à água.

H. Incorreta. Na e Cl formam uma ligação iônica, Na^+Cl^-, mas o desenho mostra uma ligação covalente.

I. Incorreta. O átomo de oxigênio atrai mais os elétrons do que o átomo de carbono. Portanto, a polaridade das duas ligações deve ser invertida.

J. Essa é a estrutura correta da glicose.

K. Praticamente correta. É mais exato mostrar que apenas um hidrogênio é perdido do grupo $-NH_2$ e o grupo –OH é perdido do grupo –COOH.

CAPÍTULO 3

RESPOSTA 3-1 A equação representa o "fim da linha" de um grande conjunto de reações sucessivas que são catalisadas por enzimas diferentes. Como os açúcares são moléculas mais complicadas do que CO_2 e H_2O, a reação gera um estado mais ordenado dentro das células. Como exigido pela segunda lei da termodinâmica, há geração de calor nas várias etapas da via de reações que estão resumidas na equação.

RESPOSTA 3-2 Oxidação é definida como remoção de elétrons. Entretanto, (A) é uma oxidação, e (B) é uma redução. O carbono colorido em *preto* em (C) permanece basicamente sem modificação; o carbono vizinho, colorido em preto, entretanto, perde um átomo de hidrogênio (isto é, um elétron e um próton), tornando-se assim oxidado. O átomo de carbono colorido em *preto* em (D) se torna oxidado porque ele perde um átomo de hidrogênio, e o átomo de carbono em (E) se torna reduzido porque ganha um átomo de hidrogênio.

RESPOSTA 3-3

A. Os dois estados da moeda, H e T, têm igual probabilidade. Portanto não há força motora, isto é, nenhuma diferença de energia que favoreça na direção de H para T ou vice-versa. Por essa razão, $\Delta G° = 0$ nessa reação. Entretanto, a reação segue se as moedas H e T não estiverem em número igual na caixa. Agora, a diferença de concentração entre H e T cria uma força motora, $\Delta G \neq 0$, até que a reação atinja o equilíbrio, isto é, até que haja um número igual de H e de T.

B. A quantidade de agitação corresponde à temperatura, pois é o resultado do movimento "cinético" das moedas. A energia de ativação da reação é a energia necessária para ser gasta para levantar as moedas, isto é, para mantê-las em pé pela borda, e, então, elas poderão cair deixando um ou outro lado para cima. Uma sacudida aumentará a velocidade de levantamento das moedas por diminuir a energia necessária para isso; ela poderia, por exemplo, ser um ímã que, suspenso sobre a caixa, ajudasse a levantar as moléculas. A sacudida não afetaria o ponto final de equilíbrio (com igual número de H e de T), mas aumentaria a velocidade do processo que leva ao equilíbrio, porque, com a sacudida, mais moedas poderiam levantar e cair para um dos lados.

RESPOSTA 3-4 Olhando a **Figura R3-4**, observe que $\Delta G°_{X \to Y}$ é positivo, e $\Delta G°_{Y \to Z}$ e $\Delta G°_{X \to Z}$ são negativos. O gráfico também mostra que $\Delta G°_{X \to Z} = \Delta G°_{X \to Y} + \Delta G°_{X \to Z}$. Não se sabe, com as informações fornecidas na Figura 3-12, quais as magnitudes das barreiras de energia de ativação. Por isso, elas estão desenhadas com alturas arbitrárias (linhas sólidas). Essas barreiras podem ser diminuídas por enzimas que catalisam essas reações e assim aceleram as velocidades das reações (linhas tracejadas).

RESPOSTA 3-5 As velocidades de reação podem ser limitadas (1) pela concentração do substrato, isto é, a frequência com que uma molécula de CO_2 colide com o sítio ativo da enzima; (2) por quantas dessas colisões têm energia suficiente para levar a reação adiante e (3) pelo quão rápido a enzima pode liberar os produtos da reação e assim ficar livre para ligar o próximo substrato. O diagrama da **Figura R3-5** mostra que, diminuindo a barreira da energia de ativação, mais moléculas terão energia suficiente para que ocorra a reação. A área da curva do ponto A para energia infinita ou do ponto B para energia infinita indica o número total de moléculas que reagem sem e com a presença da enzima, respectivamente. Embora o desenho não esteja em escala, a relação entre essas duas áreas seria 10^7.

RESPOSTA 3-6 Todas as reações são reversíveis. Se o composto AB pode dissociar-se para produzir A e B, então deve

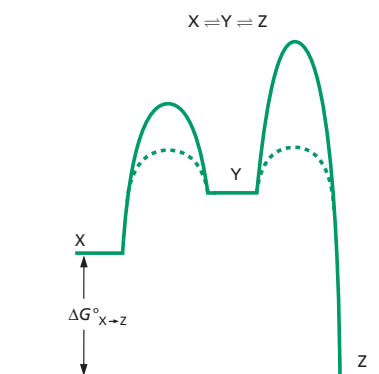
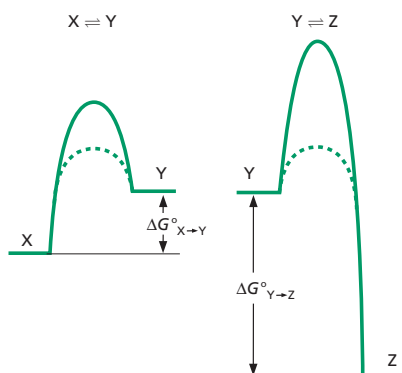



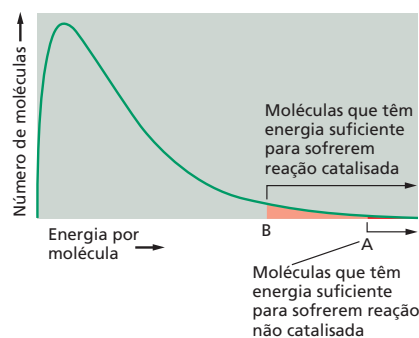
Figura R3-4

Figura R3-5

ser possível que A e B se associem para formar AB. Qual das duas reações predominará depende da constante de equilíbrio e das concentrações de A, B e AB (como é discutido na Figura 3-19). Pode-se supor que, quando essa enzima foi isolada, a atividade foi detectada fornecendo A e B em, relativamente, grandes quantidades e medindo a quantidade de AB gerada. Pode-se supor, entretanto, que nas células exista uma grande concentração de AB, de modo que sob condições normais a enzima realmente catalise AB → A + B. (Essa questão se baseia em exemplos verdadeiros, nos quais enzimas foram isoladas e receberam nomes de acordo com uma das direções da reação, mas, depois, verificou-se que nas células vivas elas catalisam a reação inversa.)

RESPOSTA 3-7

A. As pedras da Figura 3-30B fornecem a energia para levantar o balde de água. O ATP impulsiona a reação; assim, o ATP corresponde às pedras no topo do precipício. Os fragmentos correspondem a ADP e P_i, os produtos do ATP após sua energia ter sido liberada e realizado seu trabalho. A hidrólise do ATP é acoplada à conversão de X para Y. X, entretanto, é o material de partida (o balde no chão), o qual é convertido em Y (o balde no ponto mais alto).

B. (i) O despedaçamento da pedra no fundo do precipício seria uma hidrólise fútil de ATP. Na ausência de uma enzima que use a energia da hidrólise de ATP para impulsionar uma reação (que, de outro modo, seria desfavorável), a energia armazenada na ligação anidridofosfórica seria perdida como calor. (ii) A energia armazenada em Y pode ser usada para impulsionar outra reação. Se Y representa a forma ativada do aminoácido X, por exemplo, ela poderá sofrer uma reação de condensação, formando uma ligação peptídica durante a síntese de proteína.

RESPOSTA 3-8 A energia livre ΔG derivada da hidrólise de ATP depende tanto de $\Delta G°$ quanto das concentrações de substrato e de produtos. Por exemplo, para determinado conjunto de concentrações, pode-se ter,

$$\Delta G = -12 \text{ kcal/mol} = -7{,}3 \text{ kcal/mol} + 0{,}616 \ln \frac{[\text{ADP}] \times [\text{P}]}{[\text{ATP}]}$$

ΔG é menor do que $\Delta G°$, principalmente porque a concentração de ATP nas células é alta (na faixa de milimolar), e a concentração de ADP é baixa (na faixa de 10 μM). Portanto, o termo da concentração nessa equação é menor do que 1, e o seu logaritmo é um número negativo.

$\Delta G°$ é uma constante para a reação e não varia em função das condições da reação. ΔG, por outro lado, depende das concentrações de ATP, ADP e fosfato, que podem ser diferentes entre as células.

RESPOSTA 3-9 As reações B, C, D e E necessitam ser acopladas a outras, energicamente favoráveis. Em cada caso, são formadas estruturas com alto grau de organização e que são mais complicadas e têm ligações com mais energia do que o material de partida. De maneira oposta, a resposta A é uma reação catabólica que leva os compostos a um estado de baixa energia e que ocorre espontaneamente.

RESPOSTA 3-10

A. Praticamente certa, mas, falando rigorosamente, falsa. Pelo fato de as enzimas acelerarem a velocidade, mas não alterarem o equilíbrio da reação, a reação sempre ocorrerá na ausência de enzima, embora com uma velocidade minúscula. Além disso, reações que competem pelo mesmo substrato podem usá-lo mais rapidamente, impedindo mais ainda a reação desejada. Assim, em termos práticos, sem enzima, algumas reações nunca podem ocorrer em um grau apreciável.

B. Falsa. Elétrons de alta energia são transferidos mais facilmente, isto é, estão ligados mais frouxamente à molécula doadora. Isso não significa que eles se movam mais rapidamente.

C. Correta. A hidrólise de uma molécula de ATP para formar AMP também produz uma molécula de pirofosfato (PP_i), que,

por sua vez, é hidrolisada em duas moléculas de fosfato. Essa segunda reação libera praticamente a mesma quantidade de energia que a hidrólise inicial de ATP, chegando quase a dobrar a produção de energia.

D. Correta. Oxidação é remoção de elétrons, o que reduz o diâmetro do átomo de carbono.
E. Correta. O ATP, por exemplo, pode doar tanto energia quanto um grupo fosfato.
F. Falsa. As células vivas têm um tipo particular de química no qual a maioria das oxidações são eventos que liberam energia. Sob condições diferentes, entretanto, como em uma atmosfera de hidrogênio, reduções podem ser eventos de liberação de energia.
G. Falsa. Todas as células, incluindo as dos animais de sangue quente e de sangue frio, irradiam quantidades comparáveis de calor como consequência das suas reações metabólicas. No caso das células bacterianas, por exemplo, isso é evidenciado quando um monte de esterco esquenta.
H. Falsa. A constante de equilíbrio da reação $X \rightleftharpoons Y$ permanece invariável. Se Y é removido por uma segunda reação, mais X é convertido em Y, de modo que a relação entre X e Y permanece constante.

RESPOSTA 3-11 A diferença de energia livre ($\Delta G°$) entre Y e X devida a três ligações de hidrogênio é – 3 kcal/mol. (Observe que a energia livre de Y é menor do que a de X, porque há necessidade de gasto de energia para romper as ligações e converter Y em X. Portanto, o valor de $\Delta G°$ para a transição $X \rightarrow Y$ é negativo.) A constante de equilíbrio para a reação é cerca de 100 (da Tabela 3-1, p. 96), isto é, no equilíbrio, existem 100 vezes mais moléculas de Y do que X. A existência de três ligações de hidrogênio a mais aumenta $\Delta G°$ para –6 kcal/mol e aumenta a constante de equilíbrio uma vez mais por 100 vezes, para 10^4. Portanto, diferenças relativamente pequenas em energia podem ter um efeito importante sobre o equilíbrio.

RESPOSTA 3-12

A. A constante de equilíbrio é definida como $K = [AB]/([A] \times [B])$. Os colchetes indicam concentração. Então, se as concentrações de A, B e AB forem, cada uma, de 1 μM (10^{-6} M), K será 10^6 M^{-1} (= $10^{-6}/(10^{-6} \times 10^{-6})$)
B. De modo semelhante, se A, B e AB forem, cada um, 1 μM (10^{-9} M), então K será 10^9 M^{-1}.
C. Esse exemplo ilustra que proteínas de interação que estão presentes nas células em baixas concentrações necessitam ligarem-se uma à outra com alta afinidade para que uma proporção significativa de moléculas fique ligada no equilíbrio. Nesse caso específico, diminuindo a concentração por três ordens de magnitude (de μM para nM), necessita-se de uma mudança na constante de equilíbrio de três ordens de magnitude para manter o complexo proteico AB (correspondendo a –4,3 kcal de energia livre; ver a Tabela 3-1). Isso corresponde a cerca de 4-5 ligações de hidrogênio extras.

RESPOSTA 3-13 A afirmação está correta. O critério para definir se uma reação ocorre espontaneamente é ΔG, e não $\Delta G°$, e leva em consideração a concentração dos componentes que reagem. Uma reação com $\Delta G°$ negativa, por exemplo, não ocorrerá espontaneamente sob condições nas quais já haja um excesso de produtos, isto é, mais do que no equilíbrio. Uma reação com $\Delta G°$ positiva poderá ocorrer no sentido direto sob condições nas quais haja um enorme excesso de substrato.

RESPOSTA 3-14

A. A energia disponível em 57 moléculas de ATP (= 686/12) corresponde à energia liberada pela oxidação completa de glicose a CO_2 e H_2O.
B. A eficiência total da produção de ATP seria de cerca de 53%, calculada como a razão do número de moléculas de ATP realmente produzidas (30) dividido pelo número de moléculas de ATP que seriam obtidas se toda a energia armazenada na molécula de glicose pudesse ser convertida em energia química no ATP (57).
C. Na oxidação de 1 mol de glicose, 322 kcal (os restantes 47% das 686 kcal disponíveis em uma molécula de glicose que não foram armazenados como energia química no ATP) são liberados como calor. Essa quantidade de energia poderia aquecer o corpo de uma pessoa em 4,3 °C (= 322 kcal/75 kg). Essa quantidade de calor é significativa, considerando que uma elevação de 4 °C na temperatura leva a uma febre incapacitante (prostrante) e que 1 mol (180 g) de glicose não é mais do que duas xícaras de açúcar.
D. Se o rendimento energético fosse apenas 20%, no lugar de 53%, do exemplo anterior, 80% da energia disponível seria liberada como calor e deveria ser dissipada do corpo. A produção de calor seria mais do que 1,7 vez maior do que a normal, e o corpo sofreria um superaquecimento.
E. A fórmula química da ATP é $C_{10}H_{12}O_{13}N_5P_3$,e o seu peso molecular é, portanto, 503 g/mol. O corpo humano em repouso hidrolisa cerca de 80 moles (= 40 kg/0,503 kg/mol) de ATP em 24 horas (isso corresponde à liberação de cerca de 1.000 kcal de energia química). Uma vez que cada mol de glicose fornece 30 moles de ATP, essa quantidade de energia poderia ser produzida pela oxidação de 480 g de glicose (= 180 g/mol × 80 moles/30).

RESPOSTA 3-15 Esse cientista é, definitivamente, um charlatão. As 57 moléculas de ATP armazenariam 684 kcal (= 57 × 12 kcal) de energia química. Isso implica que a eficiência da produção de ATP a partir de glicose teria o rendimento impossível de 99%. Isso não deixaria energia alguma para ser liberada como calor, e essa liberação é necessária, segundo as leis da termodinâmica.

RESPOSTA 3-16

A. Sabe-se, a partir dos dados da Tabela 3-1 (p. 96), que uma diferença de energia livre de 4,3 kcal/mol corresponde a uma constante de equilíbrio de 10^{-3}, isto é, $[A^*]/[A] = 10^{-3}$. Portanto, a concentração de A* é 1.000 vezes menor do que a concentração de A.
B. A relação entre A e A* não pode ser modificada. Diminuindo a barreira da energia de ativação haverá uma aceleração da velocidade da reação, isto é, em um dado tempo haverá mais moléculas sendo convertidas de $A \rightarrow A^*$ e de $A^* \rightarrow A$, mas sem afetar o ponto de equilíbrio.

RESPOSTA 3-17

A. Provavelmente, será seguro comer o cogumelo mutante. A hidrólise de ATP fornece aproximadamente –12 kcal/mol de energia. Essa quantidade de energia altera o ponto de equilíbrio da reação por um fator enorme: cerca de 10^8 vezes (na Tabela 3-1, p. 96, veja que –5,7 kcal/mol corresponde a uma constante de equilíbrio de 10^4, assim –12 kcal/mol cor-

respondem a cerca de 10^8. Observe que, no caso de reações acopladas, as energias são aditivas e que as constantes de equilíbrio são multiplicadas). Consequentemente, se a energia da hidrólise de ATP não puder ser utilizada pela enzima, o envenenamento será 10^8 vezes menor. Esse exemplo ilustra que o acoplamento de uma reação à hidrólise de uma molécula carreadora ativada pode mudar drasticamente o ponto de equilíbrio.

B. Seria um risco consumir o organismo mutante. A diminuição da velocidade da reação não afetaria o ponto de equilíbrio, e a reação poderia ocorrer por tempo longo o suficiente; o organismo mutante aparentaria estar repleto de veneno. Talvez a reação nunca atingisse o equilíbrio, mas não seria prudente correr esse risco.

RESPOSTA 3-18 A enzima A é benéfica. Ela permite a interconversão de duas moléculas carreadoras de energia, ambas necessárias na forma de trifofosfato para muitas reações metabólicas. Todo o ADP formado é rapidamente convertido em ATP, e é assim que as células mantêm uma relação ATP/ ADP alta. Em virtude da enzima A, denominada nucleotídeo-fosfocinase, parte do ATP é usado para manter a relação GTP/GDP igualmente alta.

A enzima B seria altamente prejudicial para as células. As células usam NAD^+ como aceptor de elétrons nas reações catabólicas e devem manter uma alta concentração do carreador nessa forma para degradar glicose e produzir ATP. Por outro lado, NADH é usada como um doador de elétrons nas reações biossintéticas e é mantida em altas concentrações nas células para permitir a síntese de nucleotídeos, ácidos graxos e outras moléculas essenciais. Caso a enzima B esgotasse as reservas celulares de NAD^+ e de NADPH, haveria redução tanto das reações do catabolismo como das reações biossintéticas.

RESPOSTA 3-19 Uma vez que as enzimas são catalisadores, as reações enzimáticas devem ser termodiamicamente factíveis. A enzima apenas diminui a barreira da energia de ativação, barreira que diminuí a velocidade com que a reação ocorre. O calor confere mais energia cinética ao substrato, e assim uma fração maior de substrato pode ultrapassar a barreira da energia de ativação. Muitos substratos, entretanto, têm muitas maneiras diferentes de reagir, e todas essas vias potenciais são aumentadas pelo calor. Por outro lado, uma enzima dá seletividade e facilita apenas uma determinada via que, durante a evolução, foi selecionada como sendo de utilidade para as células. O calor, portanto, não é um substituto para a função das enzimas, e a canja de galinha deve exercer seus efeitos benéficos por um outro mecanismo ainda por serem descobertos.

RESPOSTA 3-20

A. Quando [S] < < K_M, o termo ([S + K_M) *se* aproxima de K_M. Então, a equação é simplificada para velocidade = $V_{máx}/K_M$[S], isto é, a velocidade é proporcional à [S].

B. Quando [S] = K_M, o termo ([S]/[S] + K_M) se iguala a $^1/_2$. Assim, a velocidade da reação é metade da velocidade máxima $V_{máx}$.

C. Se [S] > > K_M, o termo ([S] + K_M) tende à [S]. Assim, [S]/([S] + *K*M) é igual a 1, e a reação ocorre com sua velocidade máxima $V_{máx}$.

RESPOSTA 3-21 A concentração do substrato é 1 mM. Esse valor pode ser obtido substituindo valores na equação. Entretanto é simples observar que a velocidade desejada (50 µmol/s) é exatamente metade da velocidade máxima ($V_{máx}$), e então a

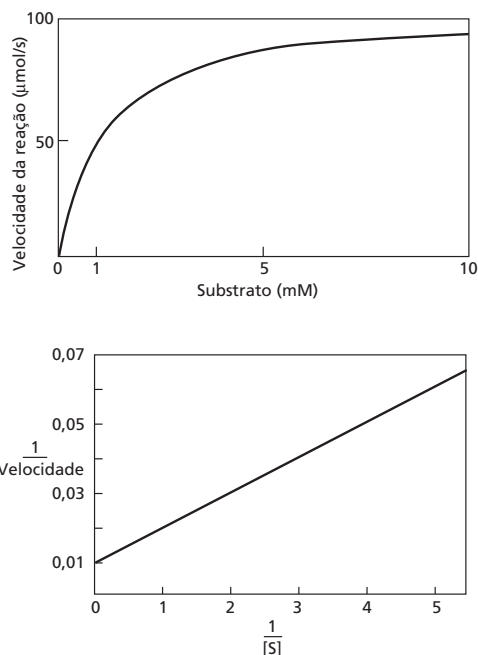



Figura R3-21

concentração do substrato se iguala ao K_M. Os dois gráficos solicitados estão mostrados na **Figura R3-21**. Um gráfico 1/velocidade *versus* 1/[S] é uma linha reta, porque o rearranjo da equação-padrão produz a equação da Questão 3-23 B.

RESPOSTA 3-22 Se [S] for muito menor do que K_M, o sítio ativo da enzima está predominantemente desocupado. Se [S] for muito maior do que k_M, a velocidade da reação é limitada pela concentração de enzima (porque a maior parte dos sítios catalíticos estará totalmente ocupada).

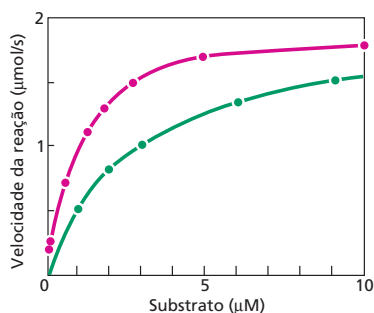
RESPOSTA 3-23

A, B. Os dados nos quadros foram usados para plotar a curva vermelha e a linha vermelha na **Figura R3-23**. Pelos dados plotados, o K_M é 1 µM, e a $V_{máx}$ é 2 µmol/min. Note que os dados são muito mais fáceis de interpretar no gráfico linear, pois a curva em (A) se aproxima de, mas nunca atinge, $V_{máx}$.

C. É importante que apenas uma pequena quantidade de produto seja produzida, pois, do contrário, a velocidade da reação diminuiria, à medida que o substrato se esgotasse e o produto se acumulasse. Assim, as velocidades medidas seriam menores do que deveriam ser.

D. Se o K_M aumenta, a concentração de substrato necessária para produzir a metade da velocidade máxima aumenta. Como mais substrato é necessário para produzir a mesma velocidade, a reação catalisada pela enzima foi inibida pela fosforilação. Os dados esperados para a enzima fosforilada são a curva verde e a linha verde na Figura R3-23.

CAPÍTULO 4

RESPOSTA 4-1 A ureia é uma pequena molécula que funciona eficientemente tanto como doador de hidrogênio (por meio de

DADOS PARA A E B

[S] (μM)	$\frac{1}{[S]}\left[\frac{1}{\mu M}\right]$	velocidade/ (μmol/min)	$\frac{1}{\text{velocidade}}\left[\frac{min}{\mu mol}\right]$
0,08	12,50	0,15	6,7
0,12	8,30	0,21	4,8
0,54	1,85	0,70	1,4
1,23	0,81	1,1	0,91
1,82	0,56	1,3	0,77
2,72	0,37	1,5	0,67
4,94	0,20	1,7	0,59
10,00	0,10	1,8	0,56

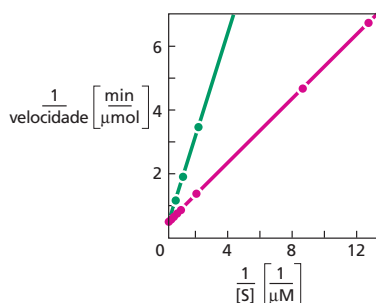



Figura R3-23

seus grupos $-NH_2$) quanto como aceptor de hidrogênio (por meio de seus grupos $-C{=}O$). Desse modo, a ureia pode colocar-se entre as pontes de hidrogênio que estabilizam moléculas proteicas, desestabilizando sua estrutura. As cadeias laterais apolares são mantidas no interior de uma proteína enovelada, pois desorganizam a estrutura da água quando expostas. Em altas concentrações de ureia, a rede de pontes de hidrogênio formada por moléculas de água se torna desorganizada, diminuindo as forças hidrofóbicas. As proteínas desnaturam na presença de ureia em consequência desses dois fenômenos.

RESPOSTA 4-2 Há duas α-hélices, e ambas são dextrógiras. As três cadeias que formam a porção maior de folhas β *(verde)* são antiparalelas. Não há "nós" na cadeia polipeptídica, provavelmente porque um nó poderia interferir no enovelamento da proteína na sua conformação tridimensional, logo após sua síntese.

RESPOSTA 4-3 A sequência é composta por aminoácidos apolares e polares ou carregados, intercalados. A fita resultante em uma folha β será polar em um de seus lados e hidrofóbica no outro. Essa fita provavelmente será circundada por outras estruturas similares, formando uma folha com uma face polar e uma hidrofóbica. Em uma proteína, essa folha β (chamada de anfipática, do grego *amphi*, "dos dois tipos", e *pathos*, paixão; em função das suas duas superfícies com propriedades diferentes) estará posicionada de modo que sua face hidrofóbica esteja voltada para o interior da proteína e sua face polar esteja na superfície, exposta à água.

RESPOSTA 4-4 Mutações benéficas a um organismo são selecionadas na evolução por conferirem vantagens na sua sobrevivência. Por exemplo, a mutação pode conferir um melhor aproveitamento das fontes de alimento; maior resistência às dificuldades ambientais, como calor ou concentração salina; maior capacidade de atrair um parceiro para a reprodução sexuada. O acúmulo de proteínas sem função é prejudicial ao organismo. Proteínas mutantes sem função representam desperdício da energia metabólica empregada na sua síntese. Caso essas proteínas mutantes sejam produzidas em excesso, a síntese de proteínas normais será prejudicada, pois a capacidade de síntese de uma célula é limitada. Em casos mais graves, as proteínas mutantes podem interferir no funcionamento normal da célula; uma enzima mutante que ainda consiga ligar uma molécula carreadora ativada, mas que não realize a catálise da reação, por exemplo, pode competir pela quantidade limitada dessa molécula carreadora, inibindo o processo normal. A seleção natural tem grande impacto na degradação e na perda de proteínas mutantes sem função ou deletérias.

RESPOSTA 4-5 Agentes redutores fortes que rompam todas as ligações S-S causariam a dissociação de todos os filamentos de queratina. Sob essas condições, o cabelo se desintegraria. Agentes redutores fortes são comercializados na forma de cremes depilatórios. No entanto, agentes redutores suaves são utilizados em tratamentos que alisam ou enrolam o cabelo, esse último necessitando de materiais que enrolem o cabelo (ver **Figura R4-5**).

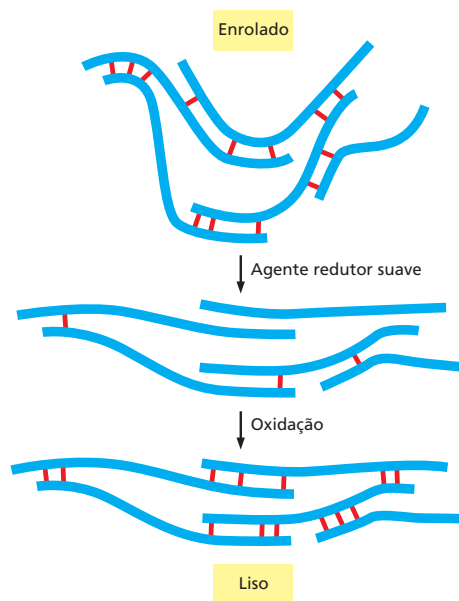



Figura R4-5

RESPOSTA 4-6 Ver **Figura R4-6**.

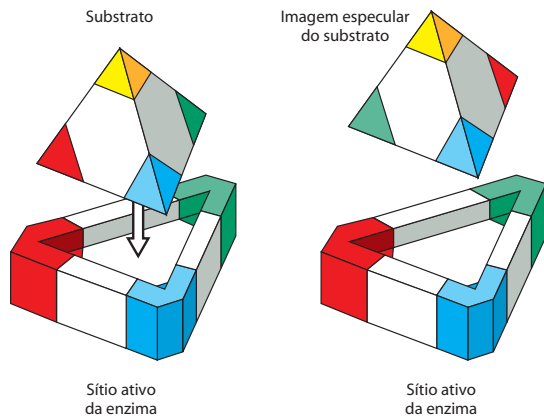



Figura R4-6

RESPOSTA 4-7

A. A retroalimentação negativa de Z que afeta a reação de B → C aumentará o fluxo na via B → X → Y → Z, pois a conversão de B em C está inibida. Dessa forma, quanto maior a concentração de Z, mais sua produção será estimulada. Isso exemplifica uma amplificação descontrolada de uma via.
B. A retroalimentação negativa de Z afetando Y → Z controla a produção de Z. Nesse esquema, entretanto, X e Y ainda são sintetizados normalmente, mesmo que esses dois intermediários não sejam mais necessários. Essa via é, portanto, menos eficiente do que a mostrada na Figura 4-34.
C. Se Z fosse um controlador positivo na etapa B → X, quanto maior fosse a síntese de Z, mais a conversão de B em X seria estimulada, favorecendo a via produtora de Z. Isso resultaria em uma amplificação da síntese de Z similar à descrita em (A).
D. Se Z fosse um controlador positivo da etapa B → C, o acúmulo de Z induziria a via para a maior produção de C. Essa é uma segunda maneira possível, juntamente à mostrada na figura, de equilibrar a distribuição de compostos entre duas ramificações de uma mesma via.

RESPOSTA 4-8 Tanto a ligação de nucleotídeos quanto a fosforilação podem induzir mudanças alostéricas em proteínas. Esse processo pode ter múltiplas consequências, como alterações na atividade enzimática, mudanças significativas na forma e mudança na afinidade da proteína por outras proteínas ou por pequenas moléculas. Ambos os mecanismos são versáteis. Uma vantagem da ligação de nucleotídeos é a maior velocidade em que pequenas moléculas se difundem para a proteína; as mudanças estruturais que acompanham o funcionamento de proteínas motoras, por exemplo, requerem a reposição rápida de nucleotídeos. Se os diferentes estados conformacionais de uma proteína motora fossem controladas por fosforilação, por exemplo, uma proteína-cinase teria de difundir-se, a cada passo, um processo muito mais lento, ou estar associada permanentemente à proteína motora. A vantagem da fosforilação é que ela requer apenas um aminoácido da superfície da proteína, e não um sítio de ligação específico. Fosfatos podem ser adicionados a diferentes aminoácidos em uma mesma proteína (desde que existam proteínas-cinase específicas para tal), aumentando significativamente a complexidade de regulação possível para uma mesma proteína.

RESPOSTA 4-9 Trabalhando como um complexo, todas as proteínas contribuem para a especificidade (ligando o cofre e a chave diretamente), ajudam no posicionamento correto de cada uma e fornecem a força mecânica para realizar uma tarefa que não seria possível individualmente (p. ex., a chave é segurada por duas subunidades). Suas funções geralmente são controladas no tempo (p. ex., a ligação de ATP em uma subunidade supre a demanda de outra molécula de ATP hidrolisada a ADP por uma outra subunidade).

RESPOSTA 4-10

A. Verdadeiro. Apenas poucos aminoácidos fazem parte do sítio ativo. O resto da proteína mantém a cadeia polipeptídica na sua conformação correta, provendo sítios de ligação adicionais para fins regulatórios, além de situar a proteína na célula.
B. Verdadeiro. Algumas enzimas formam ligações covalentes com seus substratos (ver Figura 13-5); entretanto, em todos os casos, a enzima volta à sua conformação original após a reação.
C. Falso. Folhas β podem, em princípio, conter qualquer número de unidades, pois as duas cadeias que compõem a estrutura básica da folha β podem formar pontes de hidrogênio com outras cadeias (folhas β encontradas nas proteínas conhecidas possuem de 2 a 16 cadeias ou unidades).
D. Falso. A especificidade de um anticorpo está contida exclusivamente nas voltas da sua superfície; porém, essas voltas estão tanto no domínio de cadeia leve quanto no domínio de cadeia pesada (ver Figura 4-29).
E. Falso. Os arranjos possíveis de aminoácidos que originam proteínas enoveladas estáveis são tão poucos que muitas das novas proteínas surgem a partir de alterações das proteínas já existentes.
F. Verdadeiro. Enzimas alostéricas geralmente se ligam a uma ou mais moléculas que funcionam como reguladoras em sítios distintos do sítio ativo.
G. Falso. Ligações não covalentes são as que mais contribuem para a formação da estrutura tridimensional de macromoléculas.
H. Falso. A cromatografia de afinidade separa macromoléculas pela interação com ligantes específicos, e não pela sua carga.
I. Falso. Quanto maior uma organela, maior é a força centrífuga sobre ela, o que leva à sua sedimentação; mesmo que haja mais resistência por atrito com o líquido onde se move.

RESPOSTA 4-11 Em uma α-hélice e na cadeia central de uma folha β, todos os grupos N–H e C=O da cadeia principal estão ligados por pontes de hidrogênio. Essas ligações conferem estabilidade a esses elementos de estrutura secundária, permitindo que se formem a partir de diferentes sequências de aminoácidos.

RESPOSTA 4-12 Não. Ela não teria a mesma estrutura e nenhuma parecida, pois a ligação peptídica possui polaridade. Olhando dois aminoácidos sequenciais em uma cadeia polipeptídica, o que está mais próximo da porção N-terminal contribui com grupo carboxila e o outro aminoácido contribui com o grupo amino da ligação peptídica que os une. Modificando sua

ordem, as cadeias laterais mudam de posição em relação à cadeia principal, modificando o seu meio químico.

RESPOSTA 4-13 São necessários 3,6 resíduos de aminoácidos para completar uma volta em uma α-hélice; essa sequência de 14 aminoácidos pode formar quase 4 voltas completas. Os aminoácidos polares e os hidrofóbicos estão espaçados de forma que os resíduos polares estejam em um lado da hélice e os resíduos hidrofóbicos no outro, formando uma hélice anfipática. É provável que essa hélice anfipática esteja exposta à superfície da proteína, com sua face hidrofóbica voltada para o interior. Duas hélices desse tipo podem enrolar-se uma sobre a outra como mostrado na Figura 4-13.

RESPOSTA 4-14

A. ES representa o complexo enzima-substrato.
B. Enzima e substrato estão em equilíbrio entre os estados livre e ligados; uma vez ligada à enzima, a molécula de substrato pode dissociar-se (por isso, a seta bidirecional) ou ser convertida em produto. Quando o substrato é convertido em produto (com a liberação concomitante de energia), a reação é direcionada para a esquerda, como indicado pela seta unidirecional.
C. A enzima é o catalisador e, portanto, é liberada sem modificações após a reação; assim, E aparece nas duas pontas da equação.
D. Geralmente os produtos de uma reação se parecem estruturalmente com o substrato, podendo também ligar-se à enzima. Uma enzima ligada ao seu produto (no complexo EP, por exemplo) não está disponível para catalisar a reação; assim, excesso de P inibe a reação pela diminuição da concentração de E livre.
E. O composto X é um inibidor da reação e funciona por meio da formação de um complexo EX. Uma vez que P precisa ser produzido para então inibir a reação, ele demora mais que X para inibir a reação, já que X está presente desde o seu início.

RESPOSTA 4-15 Os aminoácidos polares Ser, Ser-P, Lys, Gln, His e Glu podem ser encontrados na superfície da proteína, e os aminoácidos hidrofóbicos Leu, Phe, Val, Ile e Met no interior. A oxidação de duas cisteínas para a formação de uma ponte dissulfeto elimina seu potencial para formar pontes de hidrogênio, tornando-as mais hidrofóbicas. Pontes dissulfeto geralmente são encontradas no interior de proteínas. Independentemente da natureza de suas cadeias laterais, os aminoácidos N e C-terminal contêm grupos carregados (os grupos amino e carboxila que marcam as terminações da cadeia polipeptídica) e são encontrados na superfície da proteína.

RESPOSTA 4-16 Muitos elementos de estrutura secundária não são estáveis quando isolados, requerendo a presença de partes adicionais da cadeia polipeptídica para manterem sua estrutura. Regiões hidrofóbicas que normalmente estariam no interior da proteína enovelada ficam expostas, e como essas regiões são energeticamente desfavorecidas em água, os fragmentos tenderão a se agregar de forma não específica. Esses fragmentos, portanto, não terão estrutura definida e serão inativos quanto à especificidade de ligação, mesmo que contenham todos os aminoácidos que normalmente contribuiriam para essa função. Um domínio proteico, em contrapartida, é considerado uma unidade de enovelamento independente, e fragmentos da cadeia polipeptídica que correspondam a domínios intactos irão se enovelar corretamente. Domínios proteicos, quando separados, frequentemente retêm suas atividades, como a especificidade de ligação, caso o sítio de ligação esteja todo contido no domínio. Dessa forma, o local da cadeia polipeptídica da proteína mostrada na Figura 4-16, em que ela pode ser clivada e originar fragmentos estáveis, é na ligação entre os dois domínios (isto é, na volta entre as duas α-hélices no canto inferior direito da estrutura mostrada).

RESPOSTA 4-17 A inativação da enzima pelo calor sugere que a mutação originou uma enzima com estrutura menos estável. Por exemplo, uma ponte de hidrogênio que normalmente é formada entre dois aminoácidos pode ter sido eliminada pela mutação de um dos aminoácidos por outro que não forma pontes de hidrogênio. A falta dessa ligação, que normalmente mantém a cadeia polipeptídica enovelada corretamente, faz com que a proteína desnature em temperaturas em que seria estável. Cadeias polipeptídicas desnaturadas com aumento da temperatura em geral formam agregados e raramente retornam à estrutura inicial ativa quando a temperatura é baixada.

RESPOSTA 4-18 A proteína motora mostrada na figura pode mover-se com a mesma facilidade tanto para a direita quanto para a esquerda e não terá um movimento direcionado. Se um dos passos for associado à hidrólise de ATP (p. ex., se para soltar um dos "pés" da enzima for necessário ligar uma molécula de ATP, e para ligar esse "pé" novamente for necessário hidrolisar a molécula de ATP ligada), então a proteína terá um movimento direcionado que requer o consumo contínuo de ATP. Note que, em princípio, não faz diferença qual etapa é associada à hidrólise de ATP (**Figura R4-18**).

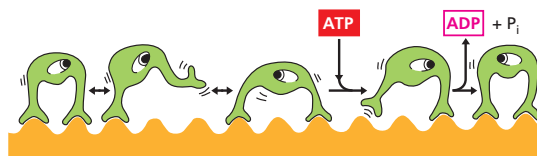



Figura R4-18

RESPOSTA 4-19 A migração lenta de moléculas pequenas através de uma coluna de gel-filtração ocorre porque as moléculas menores têm acesso a muito mais espaços nas membranas porosas da coluna do que as moléculas maiores. Entretanto, é importante dar às moléculas menores tempo suficiente para que se difundam por esses poros. Com taxas de fluxo muito rápidas, todas as moléculas se deslocariam rapidamente ao redor das membranas, e não através delas, o que faria moléculas grandes e pequenas saírem juntas da coluna.

RESPOSTA 4-20 A α-hélice é dextrógira, e a espiral enrolada é levógira. Isso ocorre em função da posição dos aminoácidos hidrofóbicos na α-hélice.

RESPOSTA 4-21 Os átomos que compõem o sítio ativo de uma proteína devem estar precisamente posicionados para encaixar as moléculas a que se ligam. As suas posições dependem, por sua vez, do correto posicionamento das cadeias laterais dos aminoácidos que ocupam o centro de uma proteína,

mesmo distantes do sítio de ligação. Portanto, mesmo uma pequena alteração no centro de uma proteína é capaz de inibir a sua função por meio da indução de alterações na conformação do seu sítio de ligação.

CAPÍTULO 5

RESPOSTA 5-1

A. Falso. A polaridade da fita de DNA normalmente se refere à orientação do seu arcabouço fosfato-açúcar.
B. Verdadeiro. Os pares de bases G-C são mantidos unidos por três pontes de hidrogênio, e os pares de bases A-T são unidos por duas pontes de hidrogênio.

RESPOSTA 5-2 A barra de escala da Figura 5-11 está em milhões de pares de nucleotídeos. Usando-a para estimar a quantidade de DNA compactado do cromossomo 1, obtém-se aproximadamente 256 milhões de pares de nucleotídeos. Isso corresponde a um comprimento total do DNA de 8,7 cm ($256 \times 10^6 \times 0{,}34$ nm; 1 nm=$1/10^9$m) e uma compactação de 8,7 cm/10 µm = 8.700 vezes.

RESPOSTA 5-3 Um octâmero de histona ocupa cerca de 9% do volume do núcleo. O volume do núcleo é:

$$V = 4/3 \times 3{,}14 \times (3 \times 10^3 \text{ nm})^3$$

$$V = 1{,}13 \times 10^{11} \text{ nm}^3$$

O volume de um octâmero de histona é:

$$V = 3{,}14 \times (4{,}5 \text{ nm})^2 \times (5 \text{ nm}) \text{ x } (32 \times 10^6)$$

$$V = 1{,}02 \times 10^{10} \text{ nm}^3$$

A proporção do volume do octâmero de histona com relação ao volume nuclear é de 0,09. Portanto, o octâmero de histona ocupa cerca de 9% do volume nuclear. O DNA também ocupa cerca de 9% do volume nuclear; assim, juntos, eles ocupam cerca de 18% do volume nuclear.

RESPOSTA 5-4 Diferentemente da maioria das proteínas, as quais acumulam trocas de aminoácido durante a sua evolução, as funções das proteínas histonas envolvem quase todos os seus aminoácidos, de modo que uma alteração em qualquer posição é deletéria para a célula. As proteínas histonas são perfeitamente refinadas para sua função.

RESPOSTA 5-5 O homem possui somente uma cópia do cromossomo X; um portador de um gene defeituoso, assim, não possui uma cópia de reserva. A mulher, por sua vez, possui duas cópias do cromossomo X, cada uma delas herdada de cada um dos pais, de modo que uma cópia defeituosa do gene de um cromossomo X pode, geralmente, ser compensada pela cópia normal do outro cromossomo. Esse é o caso dos genes que causam cegueira às cores. Entretanto, durante o desenvolvimento das fêmeas, a transcrição de um dos cromossomos X é inativada pelo fato de que o mesmo se encontra compactado em heterocromatina (Figura 5-30). Isso ocorre aleatoriamente em cada célula das fêmeas com um ou outro cromossomo X, e, portanto, algumas células irão expressar a cópia mutante defeituosa do gene, e outras irão expressar a cópia do gene normal. Isso resulta em uma retina com uma ou outra célula cone portando o gene funcional para o fotorreceptor de cor, e mulheres portadoras do gene mutante em um dos cromossomos X veem imagens coloridas com baixa resolução.

Para que uma mulher apresente cegueira para as cores, ela deve possuir os dois genes defeituosos, herdados dos pais. Seu pai deve ser portador da mutação no seu cromossomo X e, em virtude do fato dessa ser a única cópia do gene que ele possui, deve ser cego para cores. Sua mãe deve ser portadora do gene defeituoso em um ou em ambos seus cromossomos X. Sua mãe deve ser, portanto, ou cega para cores (gene defeituoso em ambos cromossomos X) ou possuir visão com resolução reduzida como descrito anteriormente. Vários tipos diferentes de cegueira hereditária para as cores são encontradas na população humana, e essa questão se aplica a apenas um tipo.

RESPOSTA 5-6

A. A fita complementar é 5′-TGATTGTGGACAAAAATCC-3′. As fitas de DNA pareadas possuem polaridades opostas, e a convenção é escrever uma única fita de DNA na direção 5′-3′.
B. O DNA é constituído por quatro nucleotídeos (100% = 13% A + x% T + y% G + z% C). Como o A pareia com o T, eles são representados em proporções equimolares no DNA. Portanto, o DNA bacteriano em questão contém 13% de timidina. Isso deixa 74% [100% – (13% + 13%)] para G e C, os quais também pareiam suas bases em proporções equimolares. Assim, $y = z = 74/2 = 37$.
C. Uma molécula de DNA de fita simples que possui N nucleotídeos de comprimento pode apresentar qualquer sequência de 4^N possível, mas o numero de fitas duplas de DNA é mais difícil de calcular. Muitas das sequências de fitas simples 4^N serão o complemento de uma outra sequência possível da lista. Por exemplo, 5′-AGTCC-3′ e 5′-GGACT-3′ da mesma molécula de DNA de fita dupla contam como uma única possibilidade de fita dupla. Se N é um número ímpar, então cada sequência de fita simples irá complementar outra sequência da lista, de modo que o número de sequências de fita dupla será $0{,}5 \times 4^N$. Se N for um número par, então haverá um pouco mais do que isso, pois algumas sequências serão autocomplementares (como 5′-ACTAGT-3′), e o número real de sequências pode ser calculado como: $0{,}5 \times 4^N \times 0{,}5 \times 4^{N/2}$.
D. Para especificar uma única sequência com N nucleotídeos de comprimento, 4^N deve ser maior do que 3×10^6. Assim, $4^N/2$ maior do que 3×10^6 equivale a N/maior do que ln (3×10^6)/ln (4) = 10,7. Assim, em média, a sequência de 11 nucleotídeos de extensão é única no genoma. Fazendo os mesmos cálculos para o tamanho do genoma de uma célula animal, obtém-se uma extensão mínima de 16 nucleotídeos. Isso mostra que uma sequência relativamente curta pode marcar uma única posição no genoma e é suficiente, por exemplo, para servir como uma marca de identidade para um gene específico.

RESPOSTA 5-7 Se as bases erradas forem incorporadas frequentemente no genoma durante a replicação do DNA, a informação genética pode não ser herdada corretamente. A vida, como a conhecemos, não é possível. Embora essas bases possam formar pares ligados por pontes de hidrogênio como indicado, essas não se acomodam na estrutura de dupla-hélice.

Assim, o ângulo no qual o resíduo A é ligado ao arcabouço de açúcar-fosfato é muito diferente no par A-C, e o espaçamento entre os dois fosfatos da fita é maior do que no par A-G, onde dois grandes anéis de purina interagem. Por isso, é energeticamente desfavorável incorporar as bases erradas na cadeia de DNA, e tais erros ocorrem raramente.

RESPOSTA 5-8

A. As bases V, W, X e Y podem formar uma molécula de dupla-hélice com o DNA com propriedades praticamente idênticas à do DNA genuíno. V sempre irá parear com X, e W, com Y. Portanto, as macromoléculas podem ser derivadas de um organismo vivo usando o mesmo princípio de replicação do genoma. Em principio, diferentes bases, como V, W, X e Y, podem ter sido selecionadas durante a evolução como os blocos de construção do DNA na Terra. (Igualmente, há mais cadeias laterais de aminoácidos possíveis do que a série de 20 que compõem as proteínas selecionadas pela evolução.)
B. Nenhuma das bases V, W, X ou Y podem substituir A, T, G ou C. Para preservar a distância entre o açúcar-fosfato da fita da dupla-hélice, uma pirimidina deve sempre parear com uma purina (ver, por exemplo, Figura 5-6). Assim, as oito combinações possíveis são V-A, V-G, W-A, W-G, X-C, X-T, Y-C e Y-T. Em virtude da posição dos grupos aceptores e doadores da ponte de hidrogênio, nenhum pareamento de bases estável irá se formar em qualquer uma dessas combinações, como mostra o pareamento V-A da **Figura R5-8**, onde somente uma ponte de hidrogênio pode ser formada.

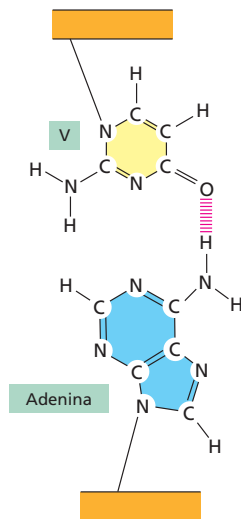



Figura R5-8

RESPOSTA 5-9 Como as fitas são mantidas unidas por pontes de hidrogênio entre as bases, a estabilidade da hélice é muito dependente do número de pontes de hidrogênio que podem ser formadas. Assim, os dois parâmetros que determinam a estabilidade: o número de pares de nucleotídeos e o número de pontes de hidrogênio que cada par de nucleotídeos contribui. Como mostrado na Figura 5-6, o par A-T contribui com duas pontes de hidrogênio, e o par G-C contribui com três pontes de hidrogênio. Portanto, a hélice C (contendo um total de 34 pontes de hidrogênio) se separa a uma temperatura mais baixa, a hélice B (contendo um total de 65 pontes de hidrogênio) é a próxima a ser separada, e a hélice A (contendo um total de 78 pontes de hidrogênio) é a mais estável, em função do seu conteúdo de GC. Além disso, o DNA de organismos que crescem em temperatura extrema, como certas bactérias de águas termais, possuem um conteúdo de G-C fora do comum.

RESPOSTA 5-10 O DNA deve ser aumentado por um fator de $2{,}5 \times 10^{6}$ ($= 5 \times 10^{-3} / 2 \times 10^{-9}$ m). Assim, a extensão do cordão seria de 2.500 km. Isso é aproximadamente a distância entre Londres e Instambul, São Francisco e a cidade do Kansas, Tókio ao extremo sul de Taiwan e Melbourne a Cairns. Nucleotídeos adjacentes estarão cerca de 0,85 mm de distância (correspondente à espessura de 12 páginas deste livro). Um gene que possui 1.000 nucleotídeos de extensão teria cerca de 85 cm de comprimento.

RESPOSTA 5-11

A. São necessários dois bites para especificar cada par de nucleotídeos (p. ex., 00, 01, 10 e 11 seriam os códigos binários para os quatro diferentes nucleotídeos, cada um pareado com seu correspondente apropriado).
B. O genoma humano inteiro (3×10^{9} pares de nucleotídeos) pode ser armazenado em dois CDs ($3 \times 10^{9} \times 2$ bites/ $4{,}8 \times 10^{9}$ bites).

RESPOSTA 5-12

A. Verdadeiro.
B. Falso. As proteínas do cerne do nucleossomo possuem aproximadamente 11 nm de diâmetro. O modelo para a forma como ela é compactada para formar o filamento de 30 nm é mostrado na Figura 5-25.

RESPOSTA 5-13 As definições dos termos podem ser encontradas no glossário. O DNA se reúne com proteínas especializadas para formar a *cromatina*. O primeiro nível de compactação, a *histona*, forma o cerne dos *nucleossomos*. No nucleossomo, o DNA é enrolado duas vezes ao redor do cerne. Entre as divisões nucleares, isto é, na interfase, a *cromatina* dos *cromossomos interfásicos* estão em uma forma relativamente estendida e dispersa no núcleo, embora em algumas regiões a *heterocromatina* permaneça condensada e transcricionalmente inativa. Durante a divisão nuclear, isto é, na mitose, os cromossomos replicados se tornam condensados em *cromossomos mitóticos*, os quais estão transcricionalmente inativos e são distribuídos entre as duas células-filhas.

RESPOSTA 5-14 As colônias são aglomerados de células que se originaram de uma única célula fundadora e cresceram com as divisões celulares. Na colônia abaixo da Figura Q5-14, o gene *Ade2* esta inativado quando localizado próximo ao telômero, mas aparentemente pode tornar-se espontaneamente ativado em algumas células, as quais então se tornam brancas. Uma vez ativado espontaneamente em uma célula, o gene *Ade2* continuará ativo nas células descendentes, resultando em grupos de células brancas (os setores brancos) da colônia. Esse resultado mostra que a inativação do gene posicionado próximo

ao telômero pode ser revertida e que essa mudança é passada para as outras gerações. Essa mudança na expressão do *Ade2* provavelmente resulta de uma descompactação espontânea da estrutura da cromatina ao redor do gene.

RESPOSTA 5-15 Na micrografia eletrônica, podem detectar-se regiões de cromatina de duas densidades diferentes. Uma região fortemente corada que corresponde à heterocromatina, e uma região mais clara que corresponde à cromatina menos compactada. A cromatina no núcleo A está, em sua maioria, na forma condensada, uma heterocromatina transcricionalmente inativa, ao passo que a maioria da cromatina do núcleo B está descompactada e, portanto, potencialmente ativa para transcrição. O núcleo A é de um reticulócito, uma célula precursora das hemácias, a qual é dedicada à produção de uma única proteína, a hemoglobina. O núcleo B é de um linfócito, o qual está ativamente transcrevendo muitos genes diferentes.

RESPOSTA 5-16 A hélice A gira para a direita. A hélice C gira para a esquerda, e a hélice B tem uma fita para a esquerda e uma fita para a direita. Há várias maneiras de se saber para que lado gira uma hélice. Para uma hélice orientada verticalmente, como aquelas da Figura Q5-14, se a fita da frente aponta para a direita, a hélice gira para a direita, se ela aponta para a esquerda, a hélice gira para a esquerda. Agora que você já sabe identificar o sentido da hélice, você ficará espantado em saber que cerca de 50% das hélices de DNA em propagandas giram para a esquerda, e assim um grande número daquelas descritas nos livros. Surpreendentemente, uma versão da Hélice B foi usada na propaganda de uma famosa conferência internacional celebrando os 30 anos do aniversário da descoberta da hélice do DNA.

RESPOSTA 5-17 A taxa de compactação em um cerne do nucleossomo é 4,5 [(146 pb × 0,34 nm/pb)/ (11 nm) = 4,5]. Se há 54 pb adicionais do DNA de ligação, então a taxa de compactação para as contas em um colar de DNA é 2,3 [(200 pb × 3,4 nm/pb) /(11 nm + {54 pb × 0,34 nm/pb}) = 2,3]. Esse primeiro nível de compactação representa somente 0,023% (2,3/10.000) do total da compactação que ocorre na mitose.

RESPOSTA 5-18 Todos os mecanismos conhecidos de alteração da estrutura da cromatina parecem ser facilmente reversíveis. Assim, em resposta a sinais específicos, qualquer modificação covalente nas cadeias laterais da lisina, da arginina e da serina das histonas podem ser removidas. Essa reversibilidade mantém uma importante flexibilidade nas vias de desenvolvimento, as quais podem ser mais difíceis de atingir para o esquema com base em um DNA hipotético.

CAPÍTULO 6

RESPOSTA 6-1

A. A distância entre as forquilhas de replicação 4 e 5 é de cerca de 280 nm e corresponde a 824 nucleotídeos (= 280/0,34). Essas duas forquilhas de replicação colidirão em cerca de 8 segundos. As forquilhas 7 e 8 se afastam uma da outra e, portanto, nunca colidirão.
B. O comprimento total do DNA mostrado na micrografia eletrônica é de cerca de 1,5 μm e corresponde a 4.400 nucleotídeos. Isso representa apenas 0,002% [= $(4.400/1,8 \times 10^8) \times$ 100%] do total de DNA de uma célula de mosca.

RESPOSTA 6-2 Embora o processo possa parecer um desperdício, não é possível fazer a verificação durante a síntese do iniciador. Para começar um novo iniciador em um segmento de DNA de fita simples, um nucleotídeo precisa ser colocado na posição e então ligado a um segundo, e a um terceiro, e assim por diante. Mesmo se esses primeiros nucleotídeos formarem um par perfeito com a fita-molde, oligonucleotídeos tão curtos se ligam com baixa afinidade, e, consequentemente, seria difícil diferenciar as bases corretas das incorretas por uma primase hipotética com atividade de verificação. A tarefa da primase é, portanto, "apenas polimerizar nucleotídeos com uma ligação razoável, não importando muito a precisão". Mais tarde, essas sequências são removidas e substituídas pela DNA-polimerase, que utiliza um DNA recém-sintetizado (portanto, verificado) como iniciador.

RESPOSTA 6-3

A. Sem a DNA-polimerase, a replicação não ocorre de jeito algum. Os iniciadores de RNA serão colocados na origem de replicação.
B. A DNA-ligase une os fragmentos de DNA produzidos na fita retardada. Na ausência da ligase, as fitas recém-sintetizadas permaneceriam como fragmentos, mas nenhum nucleotídeo seria perdido.
C. Sem o grampo deslizante, a DNA-polimerase se dissociaria frequentemente do DNA-molde. Em princípio, ela pode ligar-se novamente e continuar, mas a dissociação e a religação contínuas consumiriam muito mais tempo, reduzindo enormemente a velocidade de replicação.
D. Na ausência das enzimas de remoção do RNA, os fragmentos de RNA iriam permanecer covalentemente ligados aos fragmentos de DNA recém-replicados. A ligação não ocorreria, porque a ligase não liga RNA ao DNA. A fita retardada seria composta de fragmentos constituídos por DNA e RNA.
E. Sem a DNA-helicase, a DNA-polimerase pararia, porque ela não consegue separar as fitas do DNA original à sua frente. Pouco ou nenhum DNA será sintetizado.
F. Na ausência da primase, os iniciadores de RNA não podem iniciar a fita-líder nem a fita retardada. Portanto, a replicação não pode iniciar.

RESPOSTA 6-4 Lesões no DNA causadas por reações de desaminação e depurinação ocorrem espontaneamente. Esse tipo de lesão não resulta de erros da replicação e têm, portanto, chances iguais de ocorrer em qualquer uma das fitas. Se as enzimas de reparo de DNA reconhecerem essas lesões apenas nas fitas recém-sintetizadas, metade dos defeitos permaneceria sem correção. Consequentemente, a afirmação é falsa.

RESPOSTA 6-5 O vírus da AIDS (vírus da imunodeficiência humana, HIV) é um retrovírus e, portanto, sintetiza DNA a partir de um RNA-molde usando a transcriptase reversa. Isso provoca mutações frequentes no genoma viral. Os pacientes com AIDS normalmente apresentam diversas formas variantes do HIV, que são geneticamente diferentes do vírus original que os infectou. Esse fato traz grandes problemas no tratamento da infecção: os fármacos que bloqueiam enzimas virais essenciais funcionam apenas temporariamente, porque novas cepas de vírus resistentes a esses fármacos surgem rapidamente por mutações.

As RNA-replicases (enzimas que sintetizam RNA usando RNA como molde) também não possuem mecanismo de verificação. Portanto, vírus de RNA que replicam seus genomas diretamente (isto é, sem utilizar um DNA intermediário) também sofrem mutações frequentes. Nesses vírus, há uma tendência a produzir alterações nas proteínas do capsídeo, e assim um vírus mutado aparece como "novo" para o sistema imune; dessa forma, o

vírus não é suprimido pela imunidade produzida pela versão anterior. Isso explica parcialmente as novas cepas de vírus influenza (vírus da gripe) e os vírus do resfriado comum que surgem regularmente.

RESPOSTA 6-6 Se a fita original fosse "corrigida" usando a fita nova, que contém um erro de replicação como molde, o erro se tornaria uma mutação permanente no genoma. A informação original seria apagada no processo. Assim, se as enzimas de reparo não distinguissem as duas fitas, a chance de um determinado erro de replicação ser corrigido seria de apenas 50%.

RESPOSTA 6-7 O argumento é muito falho. Não é possível transformar uma espécie em outra simplesmente pela introdução de 1% de alterações aleatórias no DNA. É muito improvável que as 5.000 mutações que se acumulam diariamente na ausência do reparo de DNA ocorressem nas mesmas posições da sequência em que humanos e macacos diferem. Seria bastante provável que uma taxa de mutação tão alta resultasse na inativação de genes essenciais, levando à morte da célula. Além disso, o organismo humano é formado por cerca de 10^{13} células. Para você se tornar um macaco, não apenas uma célula, mas muitas precisariam ser alteradas. Mesmo assim, muitas dessas alterações teriam de acontecer durante o desenvolvimento para efetuar alterações no plano do corpo (fazendo seus braços mais compridos do que suas pernas, por exemplo).

RESPOSTA 6-8

A. Falsa. Moléculas idênticas de DNA-polimerase catalisam a síntese de DNA nas fitas líder e retardada de uma forquilha de replicação bacteriana. A forquilha de replicação é assimétrica, porque a fita retardada é sintetizada em segmentos que são posteriormente "costurados".
B. Falsa. Apenas os iniciadores de RNA são removidos pela RNA-nuclease; os fragmentos de Okazaki são os segmentos de DNA recém-sintetizados que serão, posteriormente, unidos formando a nova fita retardada.
C. Verdadeira. A DNA-polimerase tem uma taxa de erros de um a cada 10^7 nucleotídeos polimerizados. Noventa e nove por cento desses erros são corrigidos pelas enzimas de reparo de malpareamento de DNA, resultando na taxa total de erros de um a cada 10^9.
D. Verdadeira. As mutações se acumulariam rapidamente, destruindo os genes.
E. Verdadeira. Se uma base aberrante também ocorresse naturalmente no DNA, as enzimas de reparo não teriam como identificar a lesão. Haveria, portanto, 50% de chance de corrigir a fita correta.
F. Verdadeira. Geralmente, mutações múltiplas de tipos específicos precisam acumular-se antes que uma célula se torne uma célula cancerosa. Uma mutação em um gene que codifica uma enzima de reparo de DNA torna a célula mais suscetível a acumular mutações adicionais, acelerando o desenvolvimento de câncer.

RESPOSTA 6-9 Com uma única origem de replicação que gera duas forquilhas de replicação, com as DNA-polimerases em direções opostas do DNA, cada uma se movendo a 100 nucleotídeos por segundo, o número de nucleotídeos replicados em 24 horas será $1{,}73 \times 10^7$ (= $2 \times 100 \times 24 \times 60 \times 60$). Para replicar todos os 6×10^9 nucleotídeos do DNA presente na célula em 24 horas, teria de haver, no mínimo, 348 origens de replicação (= $6 \times 10^9/1{,}73 \times 10^7$). As 10.000 origens estimadas no genoma humano são, portanto, mais do que suficientes para satisfazer esse requerimento mínimo.

RESPOSTA 6-10

A. O composto A é o trifosfato de didesoxicitosina (ddCTP), idêntica ao dCTP, exceto que não possui o grupo hidroxila na posição 3' (3'–OH) do anel de açúcar. O ddCTP é reconhecido pela DNA-polimerase como dCTP sendo incorporado ao DNA. Entretanto, como não possui o grupo 3'–OH essencial à polimerização, a sua adição à fita crescente de DNA produz uma extremidade morta que não permite a adição de outro nucleotídeo à cadeia. Dessa forma, se o ddCTP for adicionado em excesso, as fitas serão sintetizadas até que o primeiro G (nucleotídeo complementar a C) seja encontrado na fita-molde. Nessa situação, então, o ddCTP será incorporado no lugar do dCTP, e o alongamento dessa fita será terminado.
B. Se o ddCTP for adicionado em cerca de 10% da concentração disponível de dCTP, existe 1 chance em 10 de ser incorporado sempre que houver um G na fita-molde. Portanto, será sintetizada uma população de segmentos de DNA, e pelos seus comprimentos, é possível deduzir a localização dos resíduos G na fita-molde. Essa estratégia forma a base dos métodos usados na determinação da sequência de nucleotídeos em um segmento de DNA (discutido no Capítulo 10).
   O mesmo fenômeno químico é explorado por um fármaco, a 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), comumente usado no tratamento de pacientes infectados pelo HIV. O AZT é convertido à forma trifosfato nas células e é incorporado na cadeia viral crescente de DNA. Como esse fármaco não possui um grupo 3'–OH, ele bloqueia a síntese de DNA e a replicação do vírus. O AZT inibe preferencialmente a replicação viral porque a transcriptase reversa possui maior afinidade pelo fármaco do que pelo trifosfato de timidina; a DNA-polimerase celular humana não tem essa preferência.
C. O composto B é o monofosfato de didesoxicitosina (ddCMP), que não possui o grupo 5'-trifosfato nem o grupo 3'–OH no anel do açúcar. Portanto, esse composto não pode fornecer a energia para promover a reação de polimerização dos nucleotídeos ao DNA e não será incorporado ao DNA. A adição desse composto não terá efeito sobre a replicação.

RESPOSTA 6-11 Para permitir o uso da energia da hidrólise do grupo 3'-trifosfato para polimerização, o crescimento da cadeia deveria ocorrer na direção oposta, ou seja, de 3'-5'. Desse modo, o mecanismo de verificação poderia ocorrer por uma atividade nucleásica 5'-3'. Essa situação descrita seria a mesma mostrada no lado esquerdo da Figura 6-15, exceto que os grupos trifosfato estariam no lado direito do DNA e do trifosfato de nucleosídeo a ser incorporado.

RESPOSTA 6-12 Ver **Figura R6-12**

RESPOSTA 6-13 Ambas as fitas do cromossomo bacteriano contêm 6×10^6 nucleotídeos. Durante a polimerização dos trifosfatos de nucleosídeo em DNA, duas ligações anidridofosfóricas são rompidas para cada nucleotídeo adicionado: o trifosfato de nucleosídeo é hidrolisado originando o monofosfato de nucleosídeo, que é incorporado à fita crescente de DNA, e o pirofosfato liberado é hidrolisado a fosfato. Assim, $1{,}2 \times 10^7$ ligações de alta energia são hidrolisadas a cada ciclo de replicação do DNA bacteriano. Isso requer 4×10^5 (= $1{,}2 \times 10^7/30$) moléculas de glicose, que pesam $1{,}2 \times 10^{-16}$ g (= 4×10^5 moléculas × 180 g/mol/ 6×10^{23} moléculas/mol), que corresponde a 0,01% do peso total da célula.

RESPOSTA 6-14 A afirmação está correta. Se o DNA das células somáticas não for suficientemente estável (isto é, se

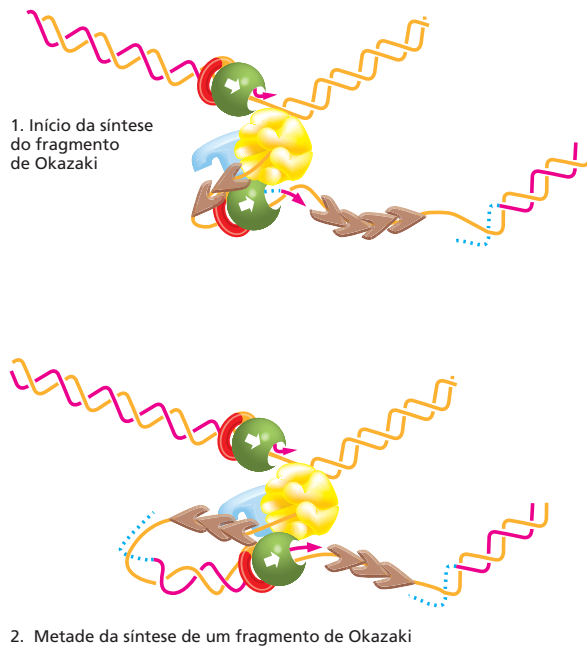



Figura R6-12

acumular mutações muito rapidamente), o organismo morre (de câncer, por exemplo), e, como isso pode ocorrer antes que o organismo possa se reproduzir, a espécie desaparecerá. Se o DNA das células reprodutivas não for suficientemente estável, várias mutações se acumularão e serão transmitidas às gerações futuras, de modo que a espécie não será mantida.

RESPOSTA 6-15 Como mostrado na **Figura R6-15**, a timina e a uracila não contêm grupos amino e, portanto, não podem ser desaminadas. A desaminação da adenina e da guanina produz anéis de purina não encontrados nos ácidos nucleicos convencionais. Em contraste, a desaminação da citosina produz uracila. Portanto, se a uracila fosse uma base de ocorrência natural no DNA, as enzimas de reparo não poderiam distinguir se uma uracila é a base correta ou resultou de uma desaminação espontânea. Entretanto, esse dilema não existe, porque apenas a timina é encontrada no DNA. Dessa forma, se uma base uracila for encontrada no DNA, será automaticamente reconhecida como um base danificada e será removida e substituída por uma citosina.

RESPOSTA 6-16

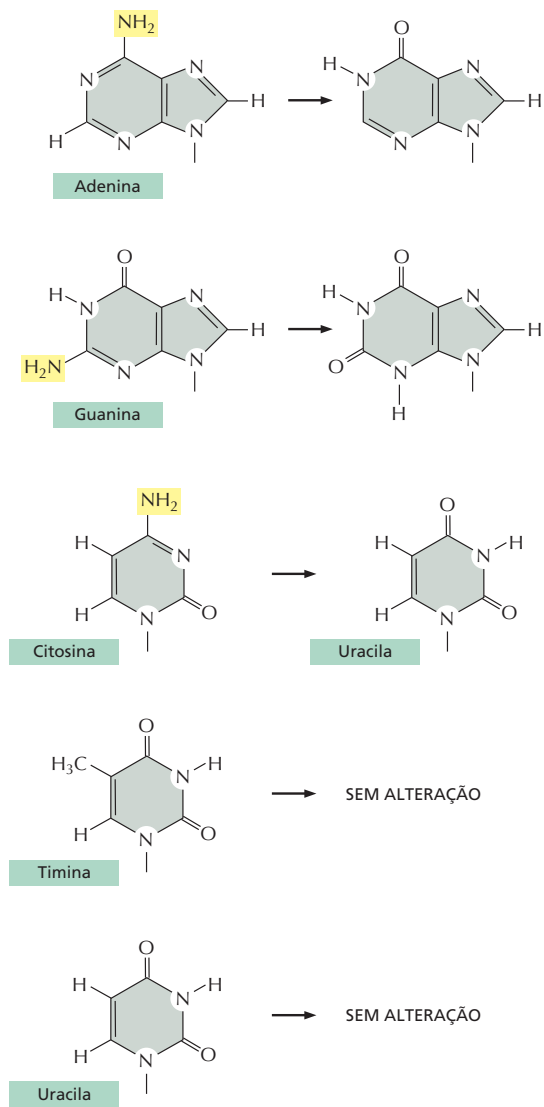
A. Como a DNA-polimerase necessita de uma extremidade 3'–OH para sintetizar DNA, na falta dos telômeros e da telomerase, as extremidades cromossômicas encurtariam a cada ciclo de replicação (**Figura R6-16**). Como os cromossomos bacterianos não possuem extremidades, esse problema não ocorre; sempre haverá um grupo 3'–OH disponível para iniciar a síntese pela DNA-polimerase que substitui o iniciador de RNA por DNA. Os telômeros e a telomerase evitam o encurtamento cromossômico porque os telômeros se estendem pela extremidade 3' de uma fita de DNA (ver Figura 6-18). Essa extensão da fita retardada molde fornece o "espaço" para iniciar os fragmentos finais Okazaki.
B. Como mostrado na Figura R6-16, os telômeros e a telomerase seriam necessários mesmo se o último fragmento da fita retardada fosse iniciado pela primase na extremidade 3' do DNA cromossômico, porque um iniciador de RNA deve ainda ser removido.

Adenina → ; Guanina → ; Citosina → Uracila ; Timina → SEM ALTERAÇÃO ; Uracila → SEM ALTERAÇÃO

Figura R6-15

RESPOSTA 6-17 Os vírus não existem como organismos de vida livre; eles não têm metabolismo, não se comunicam com outros vírus e não podem se reproduzir. Portanto, não apresentam nenhum dos atributos que são, normalmente, associados à vida. Na verdade, podem até ser cristalizados. Uma vez dentro das células, eles redirecionam a biossíntese celular normal, para a produção de mais cópias de si mesmos. Portanto, o único aspecto de "vida" que os vírus apresentam é sua capacidade de direcionar sua própria reprodução, quando dentro da célula.

RESPOSTA 6-18 Cada vez que uma outra cópia de um transpóson é inserida em um cromossomo, a alteração pode ser

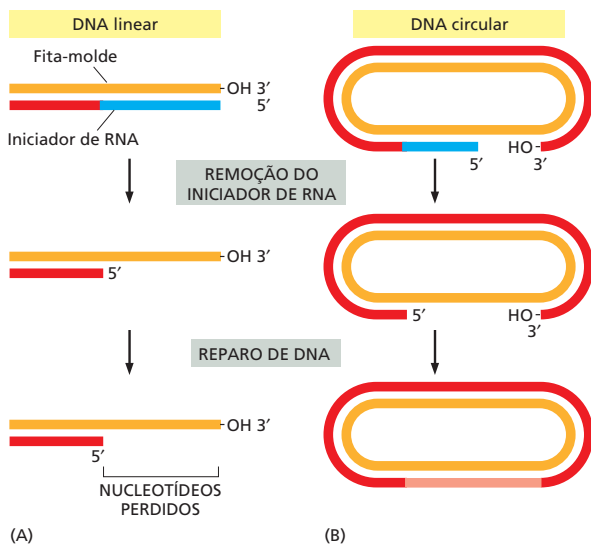



Figura R6-16

neutra, benéfica ou prejudicial ao organismo. Como a seleção natural atua contra os indivíduos que acumulam mutações prejudiciais, a proliferação dos transpósons é controlada pela seleção natural. Caso surgisse um transpóson capaz de proliferação descontrolada, a viabilidade do organismo hospedeiro dificilmente seria mantida. Por essa razão, a maioria dos transpósons evoluiu no sentido de se mover muito raramente. Muitos transpósons, por exemplo, produzem, nos raros picos de síntese, quantidades muito pequenas de transposase, a enzima necessária a seu movimento.

RESPOSTA 6-19

A. Se a única origem de replicação estivesse localizada exatamente no meio do cromossomo, levaria mais de 8 dias para replicar o DNA [= 75×10^6 nucleotídeos/(100 nucleotídeos/s)]. A taxa de replicação limitaria muito a taxa de divisão celular. (Se a origem estivesse localizada em uma das extremidades, o tempo necessário para replicação seria aproximadamente o dobro.)
B. Uma extremidade cromossômica que não está "coberta" por um telômero perderia nucleotídeos a cada ciclo de replicação de DNA e encurtaria gradualmente. Com o passar dos ciclos, genes essenciais seriam perdidos, resultando na morte celular.
C. Sem um centrômero, que fixa os cromossomos ao fuso mitótico, os dois novos cromossomos formados na replicação não poderiam ser repartidos com precisão entre as duas células-filhas. Portanto, muitas células-filhas morreriam, porque não receberiam um conjunto cromossômico completo.

CAPÍTULO 7

RESPOSTA 7-1 Talvez a resposta mais adequada tenha sido dada por Francis Crick, que cunhou o termo na metade da década de 1950: "Eu chamei essa ideia de dogma central por duas razões, penso eu. Eu já havia utilizado a óbvia palavra hipótese para a hipótese da sequência, a qual propõe que a informação genética está codificada na sequência de bases do DNA, e, além disso, eu queria sugerir que essa nova asserção era mais central e mais poderosa... A seguir, o uso da palavra dogma causou mais confusões do que deveria. Vários anos haviam se passado quando Jacques Monod salientou que eu parecia não compreender o uso correto da palavra dogma, que se refere a um conhecimento sobre o qual não se pode colocar dúvidas. Eu havia considerado isso de uma forma relativamente vaga, mas como sempre pensei que todas as crenças religiosas não apresentam bases fundamentais exatas, usei a palavra com a conotação que ela possuía para mim, e não como ela realmente era, e simplesmente apliquei-a a uma grande hipótese que, apesar de plausível, possuía pouco embasamento experimental direto naquela época". (Francis Crick, *What Mad Pursuit: A Personal View of Scientific Discovery.* Basic Books, 1988.)

RESPOSTA 7-2 As RNA-polimerases não estão se movendo, pois elas foram fixadas e revestidas com partículas metálicas durante a preparação para a microscopia eletrônica. No entanto, antes de serem fixadas, elas se moviam da esquerda para a direita, conforme indicado pelo crescimento gradual dos transcritos de RNA.

Os transcritos de RNA são mais curtos, pois dão início a um processo de dobramento (isto é, adquirem uma estrutura tridimensional) conforme são sintetizados (ver, por exemplo, a Figura 7-5), ao passo que o DNA está sob a forma de uma dupla-hélice estendida.

RESPOSTA 7-3 Inicialmente, poderíamos imaginar que a atividade catalítica de uma RNA-polimerase usada para a transcrição poderia substituir adequadamente a primase. No entanto, se pensarmos melhor, existem alguns fortes impedimentos. (1) A RNA-polimerase usada para a produção do iniciador requer iniciação de síntese em intervalos de algumas centenas de bases, o que é muito mais frequente do que o espaçamento comum de promotores sobre o DNA. A iniciação deveria, portanto, proceder de forma independente de promotores, ou seria necessário muito mais promotores presentes sobre o DNA; em ambos os casos, haveria problemas para o controle da transcrição. (2) Na mesma linha, os iniciadores de RNA usados na replicação são muito mais curtos do que mRNAs. Consequentemente, a RNA-polimerase teria de proceder a terminações muito mais frequentemente do que durante uma transcrição. A terminação teria de ocorrer espontaneamente, ou seja, sem a necessidade de uma sequência terminadora sobre o DNA, ou então muitos terminadores deveriam estar presentes. Novamente, ambos os cenários seriam problemáticos no que diz respeito ao controle da transcrição.

Apesar de ser potencialmente possível suplantar esses problemas pela ligação de proteínas controladoras especiais à RNA-polimerase durante a replicação, o problema já foi resolvido durante a evolução pelo uso de enzimas diferentes com propriedades especializadas. Alguns pequenos vírus de DNA, no entanto, utilizam a RNA-polimerase do hospedeiro para a síntese de iniciadores para sua própria replicação.

RESPOSTA 7-4 Esse experimento demonstra que o ribossomo não controla nem fiscaliza qual aminoácido está conectado a um tRNA. Após o acoplamento de um aminoácido a um tRNA, o ribossomo incorporará "cegamente" esse aminoácido na posição indicada pelo pareamento entre códon e anticódon. Podemos, portanto, concluir que uma parcela significativa da correção de leitura do código genético, isto é, a correlação do códon e do seu aminoácido correto, é realizada pelas enzimas sintetases que associam corretamente os tRNAs e os aminoácidos.

RESPOSTA 7-5 O mRNA terá uma polaridade 5′ para 3′ oposta à polaridade da fita de DNA que funcionou como molde. Assim, a sequência de mRNA será 5′– GAAAAAAGCCGUUAA-3′. O aminoácido N-terminal codificado por GAA é um ácido glutâmico. UAA especifica um códon de terminação; portanto, o aminoácido C-terminal é codificado pelo CGU e corresponde a um resíduo arginina. Observe que a convenção na descrição de uma sequência de um gene é fornecer a sequência da fita de DNA que não é utilizada como molde para a síntese do RNA; essa sequência é idêntica à do RNA transcrito, excetuando-se os Ts escritos nos locais onde no RNA estarão Us.

RESPOSTA 7-6 A primeira afirmação reproduz corretamente uma ideia relativa a um fato: acredita-se que o RNA tenha sido o primeiro catalisador de autorreplicação e que, em células modernas, ele não mais apresente a capacidade original de autorreplicação. No entanto, podemos discutir se isso representa um "rebaixamento". O RNA atualmente desempenha várias tarefas distintas na célula: como mensageiro, como adaptador para a síntese proteica, como iniciador na replicação do DNA e como catalisador de alguns dos processos mais fundamentais das células.

RESPOSTA 7-7

A Falsa. Os ribossomos podem produzir qualquer proteína que seja especificada por um dado mRNA que esteja sendo traduzido. Após a tradução, os ribossomos são liberados do mRNA e podem iniciar a tradução de um mRNA diferente.

B. Falsa. Os mRNAs são traduzidos como polímeros lineares; não existe a necessidade de eles adquirirem qualquer estrutura dobrada em particular. A formação de tais estruturas sobre o mRNA pode inibir a tradução, pois o ribossomo terá de desdobrar o mRNA para ter acesso à sua mensagem.

C. Falsa. As subunidades ribossomais trocam de parceiro após cada ciclo de tradução. Quando um ribossomo é liberado do mRNA, suas duas subunidades se dissociam e se inserem no conjunto de subunidades pequenas e grandes disponíveis a partir do qual novos ribossomos são formados para a tradução de um novo mRNA.

D. Falsa. Os ribossomos são organelas citoplasmáticas, mas não estão individualmente delimitados por membrana.

E. Falsa. A posição do promotor determina o sentido no qual ocorre a transcrição e qual das fitas de DNA será usada como molde. A transcrição rumo ao sentido oposto daria origem a um mRNA com uma sequência completamente diferente (e provavelmente sem significado algum).

F. Falsa. O RNA contém uracila, mas não timina.

G. Falsa. O nível de uma proteína depende da taxa de sua síntese e degradação, mas não de sua atividade catalítica.

RESPOSTA 7-8 Visto que a deleção no mRNA Lacheinmal é interna, é provável que ela tenha origem a partir de um defeito no *splicing*. A interpretação mais simples é que o gene *Lacheinmal* contém um éxon de tamanho igual a 173 nucleotídeos (identificado como "E2" na **Figura R7-8**) e que esse éxon é perdido durante o processamento de um precursor do mRNA mutante. Isso poderia ocorrer, por exemplo, se a mutação alterasse o sítio 3′ de *splicing* no íntron precedente ("I1") de tal forma que ele não fosse mais reconhecido pela maquinaria de *splicing* (uma alteração na sequência CAG ilustrada na Figura 7-19 poderia produzir esse resultado). As snRNPs procurariam então o próximo sítio 3′ de *splicing* disponível, o qual corresponderia à extremidade 3′ do próximo íntron ("I2"), e a reação de *splicing* removeria E2 junto aos íntros I1 e I2, produzindo um mRNA mais curto. A seguir, o mRNA seria traduzido em uma proteína defectiva, ocasionando a deficiência em Lacheinmal.

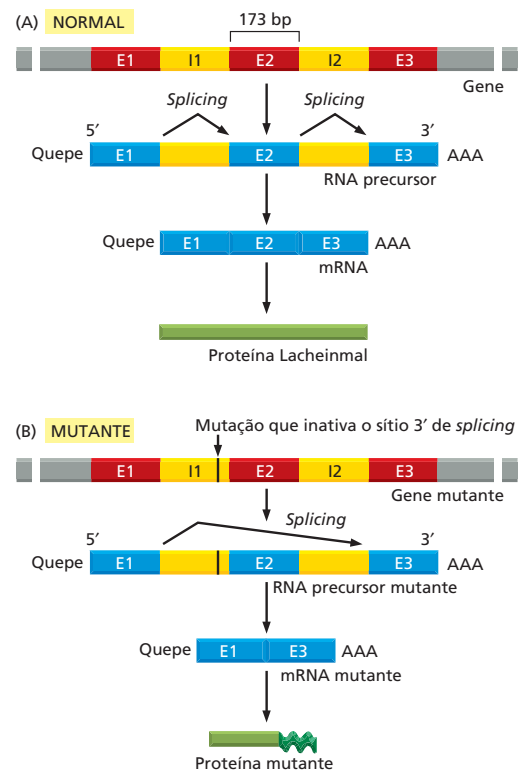



Figura R7-8

Visto que 173 nucleotídeos não correspondem a um número completo de códons, a perda desse éxon no mRNA provocaria uma alteração na fase de leitura na junção de *splicing*. Consequentemente, a proteína Lacheinmal seria sintetizada corretamente apenas ao longo do éxon E1. Quando o ribossomo começasse a traduzir as sequências sobre o éxon E3, estaria lendo em uma fase de leitura diferente e consequentemente produziria uma sequência proteica não relacionada à sequência Lacheinmal normalmente codificada pelo éxon E3. Provavelmente, o ribossomo logo encontraria um códon de terminação, o qual, em sequências de RNA que não codificam proteína, ocorre, em média, uma vez a cada 21 códons (existem três códons de terminação em um total de 64 códons possíveis no código genético).

RESPOSTA 7-9 Ambas as sequências 1 e 4 codificam o peptídeo Arg-Gly-Asp. Visto que o código genético é redundante, diferentes sequências nucleotídicas podem codificar a mesma sequência de aminoácidos.

RESPOSTA 7-10

A. Incorreta. As ligações são não covalentes, e sua formação não requer um gasto de energia.

B. Correta. O aminoacil-tRNA penetra no ribossomo no sítio A.

C. Correta. O ribossomo se move sobre o mRNA, e os tRNAs que já doaram seu aminoácido para a cadeia polipeptídica em crescimento são liberados do ribossomo e do mRNA.

A liberação ocorre dois ciclos após a entrada do tRNA no ribossomo (ver Figura 7-33).

RESPOSTA 7-11 *Replicação*. Definição do dicionário: a criação de uma cópia exata; definição da biologia molecular: o ato de duplicação do DNA. *Transcrição*. Definição do dicionário: o ato de reescrever, fazer uma cópia, principalmente de uma forma física para outra; definição da biologia molecular: o ato de copiar a informação estocada no DNA em RNA. *Tradução*. Definição do dicionário: o ato de colocar palavras em um idioma diferente; definição da biologia molecular: o ato de polimerizar aminoácidos sob uma sequência linear a partir de informação dada pela sequência linear dos nucleotídeos de um mRNA. (Observe que *translation*, o termo em inglês para "tradução", é também usado com um sentido bastante diferente, tanto na linguagem comum quanto na linguagem científica, para indicar movimento de um lugar para outro*.)

RESPOSTA 7-12 Um código composto por dois nucleotídeos poderia especificar 16 aminoácidos (= 4^2), e um código triplo no qual a posição dos nucleotídeos não é importante poderia especificar 20 diferentes aminoácidos (= 4 possibilidades de 3 bases idênticas + 12 possibilidades de 2 bases iguais e uma diferente + 4 possibilidades de 3 diferentes bases). Em ambos os casos, esse número máximo de aminoácidos deveria ser reduzido em pelo menos 1, considerando-se a necessidade de determinação de códons de terminação específicos. É relativamente fácil imaginar como um código de dois nucleotídeos poderia ser traduzido por um mecanismo similar ao utilizado em nosso planeta por tRNAs que possuíssem apenas duas bases relevantes em sua alça anticódon. No entanto, fica mais difícil imaginar como a composição nucleotídica de um segmento de três nucleotídeos poderia ser traduzida sem levar em consideração sua ordenação, pois o sistema de formação de pares de bases não poderia ser utilizado: um AUG e um UGA, por exemplo, não poderiam estabelecer pareamento com o mesmo anticódon.

RESPOSTA 7-13 É provável que, nas células primordiais, o pareamento entre códons e aminoácidos fosse menos exato do que o existente nas células atuais. A característica do código genético descrita na questão pode ter permitido que as células iniciais tolerassem essa inexatidão permitindo a existência de relações menos precisas entre conjuntos de códons mais ou menos similares e aminoácidos semelhantes. Podemos facilmente imaginar que o pareamento entre códons se tenha tornado cada vez mais exato, passo a passo, conforme a maquinaria de tradução evoluía rumo aquela que hoje encontramos nas células atuais.

RESPOSTA 7-14 O códon de Trp é 5'-UGG-3'. Assim, um tRNA-Trp normal contém a sequência 5'-CCA-3' em sua alça anticódon. Se esse tRNA contém uma mutação tal que altere seu anticódon para <u>U</u>CA, ele reconhecerá um códon UG<u>A</u> e conduzirá a incorporação de um resíduo de triptofano em vez de fazer com que a tradução seja terminada. No entanto, diversas outras sequências codificadoras de proteínas contêm códons UGA como seus códons normais de terminação, e esses códons serão também afetados pelo tRNA mutante. Dependendo da competição entre o tRNA alterado e os fatores de liberação da tradução normais (Figura 7-37), algumas dessas proteínas serão produzidas com aminoácidos adicionais em suas extremidades C-terminais. O tamanho adicional dependerá do número de códons que o ribossomo encontrar antes de chegar a um códon de terminação não UGA sobre o mRNA, na fase de leitura em que a proteína está sendo traduzida.

* N. de T. Em português, usamos nesse contexto o termo "translação".

RESPOSTA 7-15 Uma forma efetiva de fazer com que a reação ocorra é por meio da remoção de um dos produtos, de tal modo que a reação reversa não possa proceder. O ATP contém *duas* ligações de alta energia que conectam os três grupos fosfato. Na reação ilustrada, PP_i é liberado, consistindo em dois grupos fosfato ligados por uma dessas ligações de alta energia. Assim, PP_i pode ser hidrolisado com um ganho considerável de energia livre, sendo, dessa forma, eficientemente removido. Isso ocorre de forma rápida nas células e, consequentemente, as reações que produzem e a seguir hidrolisam PP_i são praticamente irreversíveis (discutido no Capítulo 3).

RESPOSTA 7-16

A. Uma molécula de titina é composta por 25.000 aminoácidos. Por consequência, são necessárias aproximadamente 3,5 horas para a síntese de uma única molécula de titina nas células musculares.
B. Visto seu grande tamanho, a probabilidade de produzir uma molécula de titina sem que ocorra um único erro é de apenas 0,08 [= $(1\text{-}10^{-4})^{25.000}$]; ou seja, apenas 8 a cada 100 moléculas de titina sintetizadas são livres de erro. Em contraste, mais de 97% das proteínas de tamanho médio sintetizadas são produzidas corretamente.
C. A taxa de erro limita o tamanho das proteínas que podem ser sintetizadas de forma exata. Desse modo, se toda a proteína ribossomal eucariótica fosse sintetizada sob a forma de uma única molécula, uma grande proporção (87%) dessa proteína ribossomal gigante hipotética potencialmente apresentaria pelo menos um erro. É mais vantajoso produzir as proteínas ribossomais individualmente, pois, assim, apenas uma pequena proporção de cada tipo de proteína será defeituosa, e essas poucas moléculas ruins podem ser individualmente eliminadas por proteólise para assegurar-se de que não existirão defeitos no ribossomo, como um todo.
D. Para calcular o tempo necessário para a síntese do mRNA da titina, você precisaria conhecer o tamanho de seu gene, o qual provavelmente deve conter muitos íntrons. A transcrição, unicamente dos éxons, necessita de aproximadamente 42 minutos. Visto que íntrons podem ser extremamente grandes, o tempo necessário para a transcrição do gene completo será provavelmente bem maior.

RESPOSTA 7-17 Mutações como as descritas em (B) e (D) são frequentemente as mais deletérias. Em ambos os casos, a fase de leitura será alterada, e, visto que essa alteração da fase de leitura ocorre próximo ao começo ou no meio da sequência codificadora, grande parte da proteína conterá uma sequência diferente e/ou truncada de aminoácidos. Em contraste, a alteração da fase de leitura que ocorre próximo à extremidade final da sequência codante, como descrito no cenário (A), resultará em uma proteína com sequência praticamente correta que poderá ser funcional. A deleção de três nucleotídeos consecutivos, cenário (C), leva à deleção de um aminoácido, mas não altera a fase de leitura. O aminoácido deletado poderá ou não ser importante para o dobramento ou atividade da proteína; muitas vezes, esse tipo de mutação é silencioso, isto é, apresenta pouca ou nenhuma consequência para o organismo. A substituição de um nucleotídeo por outro, como em (E), com muita frequência é completamente isenta de consequências.

Em alguns casos, ela não provocará alteração na sequência de aminoácidos da proteína; em outros casos, ela pode alterar um único aminoácido, e na pior das situações, ela pode criar um novo códon de terminação, dando origem a uma proteína truncada.

CAPÍTULO 8

RESPOSTA 8-1

A. A transcrição do óperon do triptofano não seria mais regulada pela ausência ou presença de triptofano; as enzimas estariam permanentemente ativadas nos cenários (1) e (2) e permanentemente desativadas no cenário (3).

B. Nos cenários (1) e (2), as moléculas do repressor de triptofano normal iriam restaurar completamente a regulação das enzimas de biossíntese de triptofano. Por outro lado, a expressão da proteína normal não apresentaria efeitos no cenário 3, porque os sítios de ligação ao repressor Trp no DNA estariam permanentemente ocupados pela proteína mutante.

RESPOSTA 8-2 Contatos podem formar-se entre a proteína e as extremidades dos pares de bases que estão expostos no sulco maior do DNA (**Figura R8-2**). As ligações responsáveis pelos contatos sequência-específicos são as pontes de hidrogênio e uma interação hidrofóbica com o grupo metila no anel pirimídico da T. Note que o arranjo dos doadores das pontes de hidrogênio e dos aceptores das pontes de hidrogênio de um par T–A é diferente do par C-G. De maneira semelhante, o arranjo dos doadores das pontes de hidrogênio e dos aceptores das pontes de hidrogênio dos pares A –T e G–C seriam diferentes um do outro e dos outros dois pares mostrados na figura. Além dos contatos mostrados na figura, as interações iônicas entre as cadeias laterais dos aminoácidos positivamente carregados da proteína e os grupos fosfato negativamente carregados do esqueleto de DNA em geral estabilizam as interações DNA-proteína.

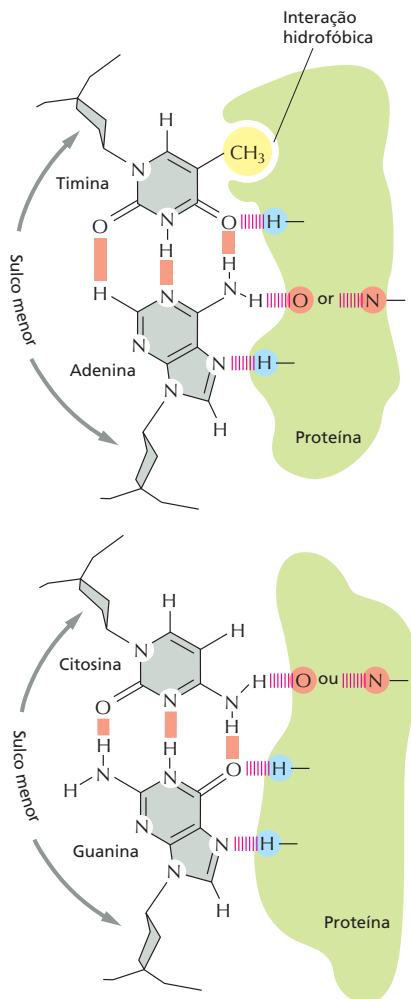



Figura R8-2

RESPOSTA 8-3 Proteínas que induzem a formação de alças podem auxiliar na aproximação de regiões de DNA distantes que normalmente entrariam em contato somente de forma ineficiente (Figura R8-3). Tais proteínas são encontradas tanto em procariotos como em eucariotos e estão envolvidas em muitos exemplos de regulação transcricional.

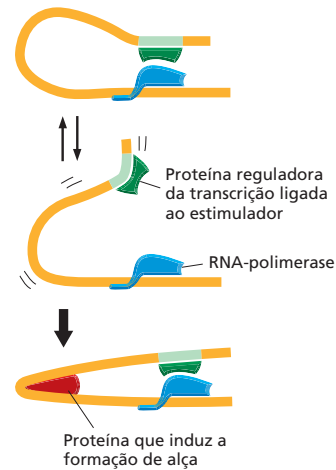



Figura R8-3

RESPOSTA 8-4

A. A luz UV desencadeia a troca do estado de prófago para o estado lítico: quando a proteína cI é destruída, Cro é produzida e desativa a produção de novas cI. O vírus inicia a produção das proteínas do envelope, e novas partículas são produzidas.

B. Quando a luz UV é desligada, o vírus permanece no estado lítico. Assim, cI e Cro formam um mecanismo de regulação gênica que "memoriza" o seu estado prévio.

C. Esse mecanismo faz sentido dentro do ciclo de vida viral: a luz UV tende a danificar o DNA bacteriano (ver Figura 6-24), tornando, assim, a bactéria em um hospedeiro não confiável para o vírus. Um prófago viral irá assim alterar-se para o estado lítico e deixará a célula irradiada na procura de novas células hospedeiras para infectar.

RESPOSTA 8-5 Falso. Cenouras podem ser cultivadas a partir de uma única célula de cenoura, e girinos podem ser obtidos pela inoculação de núcleos diferenciados de rãs nos ovos. Porém, cenouras não podem ser obtidas a partir de ovos de rãs não importa o que seja feito.

RESPOSTA 8-6

A. Verdadeiro. Os mRNAs procarióticos frequentemente são transcritos de óperons inteiros. Os ribossomos podem iniciar a tradução em sítios AUG de início internos desses mRNAs "policistrônicos" (ver Figuras 7-36 e 8-6).
B. Verdadeiro. O sulco maior do DNA de fita dupla é suficientemente largo para permitir que uma superfície proteica, tal como uma face de α-hélice, acesse os pares de bases.
C. Verdadeiro. É vantajoso exercer um controle no ponto mais precoce possível em uma via metabólica. Isso conserva energia metabólica porque não são produzidos produtos desnecessários já no primeiro momento.
D. Falso. Os átomos de zinco dos domínios dedos-de-zinco são necessários para a conformação correta do domínio proteico; eles ficam internos nesses domínios e não entram em contato com o DNA.

RESPOSTA 8-7 A partir do descobrimento dos estimuladores, poderia esperar-se que a sua função fosse relativamente independente da sua distância do sítio de ligação da RNA-polimerase – possivelmente enfraquecendo quando a distância aumentasse. A característica surpreendente dos resultados (os quais foram adaptados de um experimento real) é a periodicidade: o estimulador é maximamente ativo em certas distâncias do sítio de ligação da RNA-polimerase (50, 60 ou 70 nucleotídeos), mas quase inativa em distâncias intermediárias (55 ou 65 nucleotídeos). A periodicidade de 10 sugere que o mistério possa ser explicado considerando a estrutura da dupla-hélice de DNA, a qual se aproxima muito de 10 pares de bases por volta. Assim, colocando um estimulador no DNA à frente do promotor (**Figura R8-7**), tornaria mais difícil para o ativador que se liga a ele interagir com as proteínas ligadas ao promotor. Em distâncias maiores, há mais DNA para absorver o dobramento, e o efeito diminui.

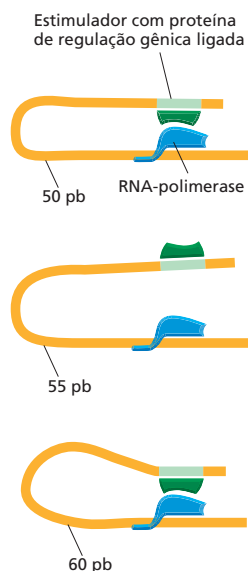



Figura R8-7

RESPOSTA 8-8 São duas as vantagens das proteínas de ligação a DNA diméricas: (1) a afinidade de ligação pode ser muito alta porque o número de contatos potenciais com o DNA é o dobro do possível com um monômero; (2) várias subunidades diferentes podem ser combinadas em muitos ajustes diferentes para aumentar o número de especificidades diversas de ligação a DNAs disponíveis para as células. Três dos domínios mais frequentemente usados envolvidos na ligação ao DNA são zíper-de-leucina, homeodomínios e dedos-de-zinco. Cada um fornece uma conformação estável específica na cadeia polipeptídica que posiciona uma α-hélice de forma apropriada na superfície da proteína de maneira que ela possa se inserir no sulco maior da hélice de DNA e fazer contato com as laterais dos pares de bases (ver Figura 8-5).

RESPOSTA 8-9 A afinidade do repressor dimérico λ para o seu sítio de ligação é a soma de todas as interações feitas pelos domínios de ligação ao DNA. Um domínio de ligação ao DNA individual fará somente a metade dos contatos e fornecerá somente a metade da energia de ligação de um dímero. Assim, embora a concentração dos domínios de ligação esteja inalterada, a sua ligação aos monômeros é fraca o suficiente para que eles não rivalizem com a ligação da RNA-polimerase. Como resultado, os genes para o crescimento lítico são ativados.

RESPOSTA 8-10 A função desses genes *Arg* é sintetizar arginina. Quando a arginina estiver abundante, a expressão dos genes biossintéticos deve ser desligada. Se ArgR atuar como um repressor gênico (o que ele faz na realidade), então a ligação da arginina deveria aumentar a sua afinidade para os seus sítios regulatórios, permitindo a ela ligar-se e desativar a expressão gênica. Se ArgR, ao contrário, atuar como um ativador gênico, então se espera que a ligação da arginina reduza a sua afinidade para os seus sítios regulatórios, impedindo a sua ligação e desativando a expressão dos genes *Arg*.

RESPOSTA 8-11 Os resultados desse experimento favorecem o modelo de alça de DNA, o qual não seria afetado pela ponte proteica (contanto que ele permita que o DNA se dobre, o que ele faz). O modelo de sondagem ou sítio de entrada, entretanto, provavelmente seria afetado pela natureza da ligação entre o estimulador e o promotor. Se as proteínas se ligam no estimulador e sondam até o promotor, elas deveriam atravessar a ponte proteica. Se tais proteínas são direcionadas para explorar DNA, elas provavelmente terão dificuldades de sondar através de uma proteína.

RESPOSTA 8-12 O experimento é um que mostra que uma única célula diferenciada retirada de um tecido especializado pode recriar um organismo inteiro. Isso prova que a célula deve conter toda a informação necessária para produzir todo um organismo, incluindo todos os seus tipos celulares especializados. Experimentos desse tipo são resumidos na Figura 8-2.

RESPOSTA 8-13 Você poderia criar 16 tipos celulares diferentes com 4 proteínas de regulação gênica (todos os 8 tipos celulares mostrados na Figura 8-19, mais outros 8 criados pela adição de uma proteína de regulação gênica adicional). MyoD por si próprio é suficiente para induzir a expressão gênica músculo-específica somente em certos tipos celulares, como alguns tipos de fibroblastos. A ação de MyoD é assim consistente com o modelo mostrado na Figura 8-19: se as células musculares forem especificadas, por exemplo, pela combinação das proteínas de regulação gênica 1, 3 e MyoD, então a adição de MyoD converteria apenas dois dos tipos celulares da Figura 8-19 (células F e H) para músculo.

RESPOSTA 8-14 A indução de um gene ativador que estimule a sua própria síntese pode criar um circuito de retroalimentação positiva que pode levar à memória celular. A síntese continuada autoestimulada, que pode levar à síntese do ativador A, pode, em princípio, durar por muitas gerações, servindo como uma constante lembrança de um evento em um passado distante. Por outro lado, a indução de um repressor gênico que inibe a sua própria síntese cria um circuito de retroalimentação negativa que garante uma resposta transitória a um estímulo transitório. Como o repressor R desativa a sua própria síntese, a célula irá rapidamente retornar ao estado que existia antes do sinal transitório.

RESPOSTA 8-15 Muitas proteínas de regulação gênica estão continuamente sendo produzidas na célula; ou seja, a sua expressão é constitutiva, e a atividade da proteína é controlada por sinais de dentro ou fora da célula (p. ex., a disponibilidade de nutrientes, como para o repressor Trp, ou por hormônios, como para o receptor de glicocorticoides), dessa forma ajustando o programa transcricional para as necessidades fisiológicas da célula. Além disso, uma dada proteína de regulação gênica normalmente equilibra a expressão de muitos genes diferentes. As proteínas de regulação gênica são frequentemente usadas em várias combinações e podem afetar a atividade umas das outras, aumentando, dessa forma, ainda mais o repertório regulatório possível de expressão gênica com um conjunto limitado de proteínas. Entretanto, a célula devota uma grande fração do seu genoma ao controle da transcrição: estima-se que 10% de todos os genes nas células eucarióticas codificam para proteínas de regulação gênica.

CAPÍTULO 9

RESPOSTA 9-1 A resposta reside na necessidade de a célula manter um balanço entre estabilidade e mudança. Se a taxa de mutação fosse muito alta, uma espécie eventualmente morreria, porque todos os seus indivíduos acumulariam várias mutações em genes essenciais para a sua sobrevivência. Para uma espécie ser bem-sucedida – em termos evolutivos –, é importante para os membros individuais possuírem uma boa memória genética, isto é, fidelidade na replicação do DNA. Ao mesmo tempo, variações ocasionais são necessárias para a espécie adaptar-se às alterações das condições. Se a mudança leva a uma melhoria, ela irá persistir por seleção; se ela se provar desastrosa, o organismo individual que foi o sujeito desafortunado do experimento da natureza irá morrer, mas a espécie irá sobreviver.

RESPOSTA 9-2 Em organismos unicelulares, o genoma é a linha germinativa, e qualquer modificação é passada para a próxima geração. Por outro lado, em organismos multicelulares, a maioria das células são células somáticas e não contribuem para a próxima geração. Assim, a modificação daquelas células por transferência horizontal de genes não apresentaria consequência para a próxima geração. As células da linhagem germinativa são normalmente sequestradas para o interior dos organismos multicelulares, minimizando seus contatos com células estranhas, vírus e DNA, isolando, dessa forma, a espécie dos efeitos da transferência horizontal de genes. Todavia, a tranferência horizontal de genes é possível para organismos multicelulares. Por exemplo, genomas de algumas espécies de insetos contêm DNA que foi horizontalmente tranferido de bactérias que os infectam.

RESPOSTA 9-3 É improvável que qualquer gene comece a existir perfeitamente otimizado para a sua função. Além disso, o ambiente no qual o organismo se encontra é mutável; então, nenhum gene poderia ser indefinidamente perfeito. Como os RNAs ribossomais (e os produtos dos genes mais altamente conservados) participam nos processos fundamentais, não tem havido pressão evolutiva (e pouca liberdade de movimento) para mudanças. Não obstante, existem significantes diferenças nos RNAs ribossomais entre espécies.

RESPOSTA 9-4 Os elementos transponíveis poderiam fornecer oportunidades para eventos de recombinação homóloga, causando, assim, rearranjos genômicos. Eles poderiam inserir-se dentro de genes, possivelmente obliterando sítios de *splicing* e, portanto, alterando a proteína produzida pelo gene. Eles poderiam também inserir-se em uma região regulatória de um gene, onde a inserção entre um estimulador e um sítio de início de transcrição poderia bloquear a função do estimulador e assim reduzir o nível de expressão de um gene. Além disso, o elemento de transposição poderia, ele mesmo, conter um estimulador e assim alterar o tempo e a posição no organismo onde o gene é expresso.

RESPOSTA 9-5 Não é uma matéria simples determinar a função de um gene a partir do zero, nem existe uma receita universal de como fazer isso. Entretanto, existe uma variedade de questões-padrão que auxiliam a estreitar as possibilidades. A seguir, listamos algumas dessas questões.

Em quais tecidos o gene é expresso? Se o gene for expresso em todos os tecidos, é provável que apresente uma função geral. Se ele for expresso em um ou alguns poucos tecidos, a sua função provavelmente é mais especializada, talvez relacionada às funções especializadas dos tecidos. Se o gene é expresso no embrião, mas não no adulto, ele pode desempenhar uma função no desenvolvimento.

Em qual compartimento da célula a proteína é encontrada? Conhecer a localização subcelular da proteína – núcleo, membrana plasmática, mitocôndria, etc. – pode também auxiliar a sugerir categorias de função potencial. Por exemplo, uma proteína que está localizada na membrana plasmática provavelmente seja um transportador, um receptor ou outro componente de uma via de sinalização, uma molécula de adesão, etc.

Quais são os efeitos das mutações no gene? Mutações que eliminam ou modificam a função do produto gênico também podem fornecer indicações da função. Por exemplo, se o produto gênico é fundamental em um certo tempo durante o desenvolvimento, o embrião frequentemente irá morrer naquele estágio ou desenvolver anormalidades óbvias. A não ser que a anormalidade seja muito específica, é normalmente difícil deduzir a função. Com frequência, as ligações são indiretas, tornando-se aparentes somente após a função gênica ser conhecida.

Com quais outras proteínas a proteína codificada interage? Ao desempenharem suas funções, as proteínas em geral interagem com outras proteínas envolvidas no mesmo ou em processos intimamente relacionados. Se uma proteína que interaja pode ser identificada, e se sua função já é conhecida (por meio de pesquisas prévias ou procuras em bancos de dados), a amplitude de possíveis funções pode ser diminuída de forma drástica.

Mutações em outros genes podem alterar os efeitos da mutação no gene desconhecido? Procurar por mutações pode ser uma metodologia muito poderosa para investigar a função de genes, especialmente em organismos como bactérias e leveduras, os quais possuem sistemas genéticos simples. Embora seja muito mais difícil de executar em camundongos, esse tipo de metodologia pode, contudo, ser usado. O raciocínio para essa

estratégia é análogo ao de olhar para proteínas que interajam: os genes que interagem geneticamente estão, com frequência, envolvidos nos mesmos ou em processos intimamente relacionados. A identificação de um gene interator desse tipo (e conhecimento de sua função) forneceria uma importante indicação da função do gene desconhecido.

O endereçamento de cada uma dessas questões necessita de conhecimentos experimentais especializados e um tempo de comprometimento substancial do investigador. Não é de se admirar que progressos sejam feitos de forma muito mais rápida quando uma indicação da função gênica possa ser encontrada simplesmente pela identificação de um gene semelhante de função conhecida em um banco de dados. À medida que mais e mais genes são estudados, essa estratégia se tornará cada vez mais eficaz.

RESPOSTA 9-6 Com a sua habilidade para facilitar recombinações genéticas, os elementos genéticos móveis quase certamente desempenharam um papel importante na evolução dos organismos modernos. Eles podem facilitar as duplicações gênicas e a criação de novos genes por meio do embaralhamento de éxons, e eles podem alterar a maneira pela qual os genes existentes são expressos. Embora a transposição de um elemento genético móvel possa ser danosa para um organismo individual – se, por exemplo, ele destruir a atividade de um gene crítico –, esses elementos genéticos móveis são provavelmente benéficos para a espécie como um todo.

RESPOSTA 9-7 Em torno de 7,6% de cada gene é convertido em mRNA [(5,4 éxons/gene × 266 pares de nucleotídeos/éxon)/(19.000 pares de nucleotídeos/gene) = 7,6%]. As proteínas ocupam em torno de 28% do cromossomo 22 [(700 genes × 19.000 pares de nucleotídeos/gene)/(48 × 10^6 pares de nucleotídeos) = 27,7%]. Entretanto, mais de 90% desse DNA é composto de íntrons.

RESPOSTA 9-8 Essa afirmação é provavelmente verdadeira. Por exemplo, perto da metade do DNA é composto de elementos geneticamente móveis extintos. Entretanto, é possível que pesquisas futuras descubram uma função para esses DNAs que parecem sem importância.

RESPOSTA 9-9 Os agrupamentos dos genes *HoxD* estão empacotados com sequências regulatórias complexas e extensas que dirigem a expressão de cada um desses genes no tempo e lugar corretos durante o desenvolvimento. Acredita-se que a inserção de elementos genéticos móveis nos agrupamentos Hox D tenha sido selecionada contra porque ela destruiria a regulação adequada dos genes residentes.

RESPOSTA 9-10

A. Os éxons no gene da β-globina humana correspondem às posições de homologia (nesse caso, de identidade) com o cDNA, o qual é uma cópia direta do mRNA e, portanto, não contém íntrons. Os íntrons correspondem às regiões entre os éxons. As posições dos íntrons e éxons no gene da β-globina humana estão indicadas na **Figura R9-10A**. Também são mostradas (em barras abertas) as sequências presentes no mRNA da β-globulina madura (e no gene) que não são traduzidas em proteína.

B. A partir das posições dos éxons, como definido na Figura R9-10A, fica claro que os dois primeiros éxons do gene da β-globina humana possuem correspondentes homólogos no gene da β-globina de camundongo (Figura R9-10B). Entretanto, somente a primeira metade do terceiro éxon do gene da β-globina humana é homólogo ao gene da β-globina de camundongo. A porção homóloga do terceiro éxon contém sequência que codifica para proteína, ao passo que a porção não homóloga representa a região 3′ não traduzida do gene. Como essa porção do gene não codifica proteína (nem contém sequências regulatórias extensas), ela evolui em uma taxa semelhante à dos íntrons.

C. Os genes da β-globina humana e de camundongo também são homólogos nas suas extremidades 5′, como indicado pelo agrupamento de pontos ao longo da mesma diagonal do primeiro éxon (Figura R9-10B). Essas sequências correspondem a regiões regulatórias na frente dos sítios de início de transcrição. Sequências funcionais, as quais estão sob pressão seletiva, divergem muito mais lentamente do que sequências sem função.

D. O programa *diagon plot* mostra que o primeiro íntron é praticamente do mesmo tamanho nos genes humano e de camundongo, mas o comprimento do segundo íntron é sensivelmente diferente (Figura R9-10B). Se os íntrons fossem do mesmo tamanho, os segmentos alinhados que representam a homologia cairiam na mesma diagonal. A maneira mais fácil para testar a colinearidade dos segmentos alinhados é inclinar a página e olhar ao longo da diagonal. É impossível predizer a partir dessa comparação se a mudança em tamanho é devida ao encurtamento do íntron do camundongo ou ao alongamento do íntron humano, ou a alguma combinação dessas possibilidades.

RESPOSTA 9-11 Algoritmos computacionais que procurem por éxons são matérias complexas, como você deveria imaginar. Para identificar genes desconhecidos, esses programas combinam informações estatísticas derivadas de genes conhecidos, como:

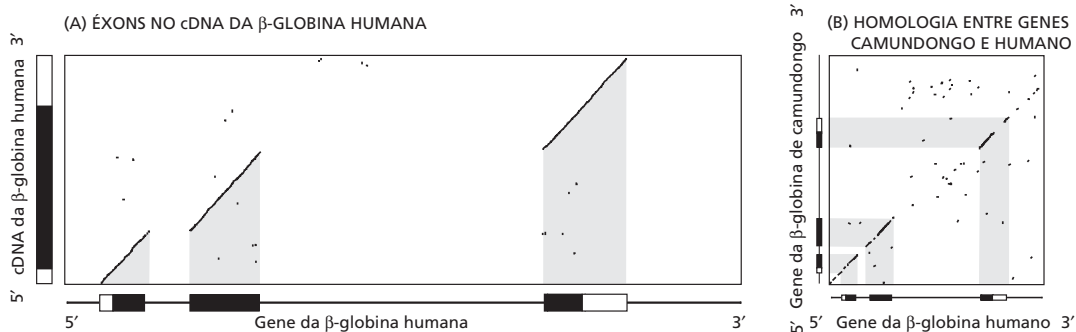



Figura R9-10

1. Um éxon que codifique uma proteína possuirá uma fase de leitura aberta. Se a sequência de aminoácidos codificada por essa fase de leitura aberta corresponde a uma sequência de uma proteína de um banco de dados, existe uma alta probabilidade de que seja um éxon autêntico.
2. As fases de leitura em éxons adjacentes no mesmo gene irão combinar-se corretamente quando as sequências de íntrons são omitidas.
3. Éxons internos (excluindo o primeiro e o último) possuirão sinais de *splicing* em cada extremidade; na maior parte do tempo (98,1%), estes serão AG nas extremidades 5′ dos éxons e GT nas extremidades 3′.
4. Os múltiplos códons para a maioria dos aminoácidos individuais não são usados com igual frequência. Esse, assim chamado, "viés de codificação" pode ser determinado para auxiliar no reconhecimento dos éxons verdadeiros.
5. Éxons e íntrons possuem distribuições de tamanho características. O comprimento médio dos éxons nos genes humanos é em torno de 120 pares de nucleotídeos. Os íntrons tendem a ser muito maiores: comprimento médio de aproximadamente 2 kb em regiões genômicas com 30-40% de conteúdo GC e um comprimento médio de aproximadamente 500 pares de nucleotídeos em regiões com conteúdo GC acima de 50%.
6. O códon de início para a síntese proteica (quase sempre ATG) possui uma associação estatística com nucleotídeos adjacentes que parecem aumentar o seu reconhecimento por fatores de tradução.
7. O éxon terminal possuirá um sinal (mais comumente AATAAA) para clivagem e poliadenilação próximo de sua extremidade 3′.

A natureza estatística dessas características acoplada com a baixa frequência da informação codificante no genoma (2-3%) e a frequência de *splicing* alternativo (estimada em 60% dos genes humanos) torna especialmente impressionante que os algoritmos atuais possam identificar aproximadamente 70% dos éxons individuais no genoma humano.

RESPOSTA 9-12 Em uma sequência muito longa ao acaso de DNA, cada um dos 64 diferentes códons será gerado com igual frequência. Como 3 dos 64 são códons de parada, será esperado que eles ocorram a cada 21 códons (64/3 = 21,3) em média.

RESPOSTA 9-13 Em princípio, a resistência a mutações do código genético sugere que ele foi submetido a forças da seleção natural. Uma consideração básica que parece razoável é a de que a resistência a mutações é uma característica importante do código genético. Esse raciocínio sugere que ele deve ter sido um acidente de sorte mesmo – grosseiramente uma chance em um milhão – para tropeçar em um código tão à prova de erros como o nosso.

Tudo isso não é tão simples! Se a resistência a mutações é uma característica essencial para qualquer código que possa suportar a complexidade de organismos como os humanos, então os únicos códigos que *poderíamos* observar são aqueles que são resistentes a erros. Um acidente estático menos favorável, dando origem a um código propenso a erros, limitaria a complexidade da vida aos organismos, os quais nunca seriam capazes de contemplar o seu código genético. Esse fato é semelhante ao princípio antrópico da cosmologia: muitos universos podem ser possíveis, mas poucos são compatíveis com vida que possa ponderar a natureza do universo.

Além dessas considerações, existem amplas evidências de que o código não é estático, e assim poderia responder às forças da seleção natural. Versões desviantes do código genético padrão têm sido identificadas nos genomas mitocondrial e nuclear de vários organismos. Em cada caso, um ou poucos códons têm adquirido um novo significado.

RESPOSTA 9-14
B. Não se acredita que a formação de genes *de novo* a partir da grande quantidade de DNA não codificante e não utilizado típico de genomas eucarióticos seja um processo significativo na evolução.

RESPOSTA 9-15
A. Como às trocas sinônimas não alteram a sequência de aminoácidos da proteína, elas normalmente não afetam a adaptabilidade geral do organismo e, portanto, não são selecionadas. Por outro lado, as trocas não sinônimas, as quais substituem com um aminoácido novo o original, podem alterar a função da proteína codificada e alterar a adaptabilidade do organismo. Uma vez que a maioria das substituições de aminoácidos é deletéria para a função da proteína, elas são selecionadas contra.
B. O gene da histona H3 precisa estar tão sensivelmente afinado à sua função que praticamente todas as substituições de aminoácidos são deletérias e, assim, são selecionadas contra. A extrema conservação da histona H3 sugere que a sua função é muito condicionada, provavelmente em virtude de interações extensas com outras proteínas e com o DNA.
C. A histona H3 claramente não está em um sítio "privilegiado" no genoma, pois ela sofre alterações nucleotídicas sinônimas na mesma taxa aproximada de outros genes.

RESPOSTA 9-16
A. Os dados na árvore filogenética (ver Figura Q9-16) refutam a hipótese de que genes de hemoglobinas de plantas tenham surgido por transferência horizontal. Olhando em partes mais familiares da árvore, vemos que as hemoglobinas dos vertebrados (peixes a humanos) se agrupam juntas como um conjunto intimamente relacionado de espécies. Hemoglobinas de plantas também formam um grupo distinto que mostra relações evolutivas amplamente encontradas, como cevada, uma monocotiledônea, divergindo antes do feijão, alfafa e lótus, as quais são todas dicotiledôneas (e legumes). O gene da hemoglobina básica, então, existe há muito tempo na evolução. A árvore filogenética da Figura Q9-16 indica que os genes de hemoglobina surgiram por meio da descendência de um ancestral comum.
B. Se os genes de hemoglobinas de plantas tivessem surgido por transferência horizontal a partir de um parasita nematódeo, então as sequências de plantas teriam-se agrupado com as sequências dos nematódeos na árvore filogenética da Figura Q9-16.

RESPOSTA 9-17 Em cada linhagem humana, novas mutações serão introduzidas em uma taxa de 10^{-10} alterações por nucleotídeo por geração celular, e a diferença entre duas linhagens humanas irá aumentar para o dobro dessa taxa. Para acumular 10^{-3} diferenças por nucleotídeo irá, portanto, levar $10^{-3}/(2 \times 10^{-10})$ gerações celulares, correspondendo a $(1/200) \times 10^{-3}/(2 \times 10^{-10})$ = 25.000 gerações humanas, ou 750.000 anos. Certamente, não descendemos de um par de humanos ancestrais geneticamente idênticos; em vez disso, é provável que todos descendamos de uma pequena população fundadora de humanos que já era geneticamente diversa. Uma análise mais sofisticada sugere que essa população fundadora existiu há aproximadamente 150.000 anos.

CAPÍTULO 10

RESPOSTA 10-1 A presença de uma mutação em um gene não significa necessariamente que a proteína expressada a partir desse é defectiva. Por exemplo, a mutação poderia alterar um códon para outro que continua especificando para o mesmo aminoácido e, dessa forma, não altera a sequência de aminoácidos da proteína. Ou a mutação pode causar uma alteração de um aminoácido para outro na proteína, mas em uma posição que não é importante para o dobramento ou para a função da proteína. Avaliando a probabilidade de que tal mutação poderia causar uma proteína defectiva, é essencial a informação sobre as mutações conhecidas da β-globina que são encontradas em humanos. Você poderia, por isso, querer saber a alteração precisa do nucleotídeo no seu gene mutante, e se essa alteração tem alguma consequência conhecida ou previsível na função da proteína codificada. Se o seu parceiro tem duas cópias normais do gene da globina, 50% dos seus filhos carregariam o seu gene defectivo.

RESPOSTA 10-2

A. Digestão com EcoRI produz dois produtos:
   `5'-AAGAATTGCGG AATTCGAGCTTAAGGGCCGCGCCGAAGCTTTAAA-3'`
   `3'-TTCTTAACGCCTTAA GCTCGAATTCCCGGCGCGGCTTCGAAATTT-5'`
B. Digestão com AluI produz três produtos:
   `5'-AAGAATTGCGGAATTCGAG CTTAAGGGCCGCGCCGAAG CTTTAAA-3'`
   `3'-TTCTTAACGCCTTAA GCTCGAATTCCCGGCGCGGCTTCGAAATTT-5'`
C. A sequência não contém nenhum sítio de clivagem para NotI.
D. A digestão com as três enzimas consequentemente produz:
   `5'-AAGAATTGCGG AATTCGAG CTTAAGGGCCGCGCCGAAG CTTTAAA-3'`
   `3'-TTCTTAACGCCTTAA GCTC GAATTCCCGGCGCGGCTTC GAAATTT-5'`

RESPOSTA 10-3 A bioquímica de proteínas ainda é muito importante, pois fornece a ligação entre a sequência de aminoácidos (que pode ser deduzida a partir de sequências de DNA) e as propriedades funcionais da proteína. Ainda não somos, por exemplo, capazes de predizer o dobramento de uma cadeia polipeptídica a partir da sua sequência de aminoácidos, de modo que em vários casos a informação em relação à função da proteína, como a sua atividade catalítica, não pode ser deduzida apenas a partir da sequência do gene. Em vez disso, tal informação deve ser obtida de forma experimental analisando as propriedades das proteínas bioquimicamente. Além disso, a informação estrutural que pode ser deduzida a partir de sequências de DNA é necessariamente incompleta. Não podemos, por exemplo, predizer com acuidade as modificações covalentes da proteína, o processamento proteolítico, a presença de pequenas moléculas ligadas fortemente ou a associação da proteína com outras subunidades. Além disso, não podemos predizer com acuidade os efeitos que essas modificações podem ter sobre a atividade proteica.

RESPOSTA 10-4

A. Depois de um ciclo adicional de amplificação, existirão 2 fragmentos marcados em cinza, 4 em verde, 4 em vermelho e 22 em amarelo; após um segundo ciclo adicional, existirão 2 fragmentos marcados em cinza, 5 em verde, 5 em vermelho e 52 em amarelo. Desse modo, os fragmentos de DNA marcados em amarelo aumentam de forma exponencial e finalmente excederão os outros produtos da reação. O seu comprimento é determinado pela sequência de DNA que cobre a distância entre os dois oligonucleotídeos mais o comprimento dos oligonucleotídeos.
B. A massa de uma molécula de DNA de 500 pares de nucleotídeos de comprimento é $5{,}5 \times 10^{-19}$ g [$= 2 \times 500 \times 330$ (g/mol)/6×10^{23} (moléculas/mol)]. Ignorando as complexidades dos primeiros ciclos da reação de amplificação (que produz produtos mais longos que por fim fazem uma contribuição insignificante para o DNA total amplificado), essa quantidade de produto aproximadamente duplica para cada etapa de amplificação. Desse modo, 100×19^{-9} g $= 2^N \times 5{,}5 \times 10^{-19}$ g, onde N é o número de ciclos de amplificação da reação. Resolvendo essa equação para $N = \log(1{,}81 \times 10^{11})/\log(2)$ resulta em $N = 37{,}4$. Assim, apenas cerca de 40 ciclos de amplificação são suficientes para amplificar DNA a partir de uma única molécula até uma quantidade que pode ser prontamente trabalhada e analisada bioquimicamente. Todo esse procedimento é automatizado e leva apenas algumas horas no laboratório.

RESPOSTA 10-5 Se as enzimas de reparo atuam no plasmídeo antes que ele seja replicado, o plasmídeo será de fato reparado nas células. Entretanto, as enzimas de reparo não conseguem distinguir qual fita de DNA contém a mutação e qual delas contém o nucleotídeo normal. Assim, na metade das células que foram transformadas com o plasmídeo errado, um gene normal é restaurado, e, na outra metade das células, a fita normal é convertida para parear com a fita mutante, e a mutação é então propagada. As células que contêm um plasmídeo com a mutação desejada podem ser identificadas pela hibridização com uma sonda de DNA de fita simples que distingue entre o gene normal e o gene mutante.

RESPOSTA 10-6 Se a proporção de trifosfato de didesoxirribonucleosídeo para trifosfato de desoxirribonucleosídeo está aumentada, a polimerização do DNA é terminada mais frequentemente, e, por isso, fitas mais curtas de DNA são produzidas. Tais condições são favoráveis para determinar sequências curtas de nucleotídeos, isto é, as sequências que estão próximas ao oligonucleotídeo utilizado na reação. Ao contrário, a diminuição da proporção entre trifosfato de didesoxirribonucleosídeo para trifosfato de desoxirribonucleosídeo permite determinar sequências nucleotídicas mais distantes do oligonucleotídeo iniciador.

RESPOSTA 10-7 Embora algumas explicações sejam possíveis, a mais simples é que a sonda de DNA tenha hibridizado predominantemente com seu mRNA correspondente, que está tipicamente presente em muito mais cópias por célula do que está o gene. As diferentes extensões de hibridização provavelmente refletem diferentes níveis de expressão gênica. Talvez cada um dos diferentes tipos celulares que compõem o tecido expressem o gene em um nível diferente.

RESPOSTA 10-8 Como a maioria dos genes de mamíferos, é possível que o gene para atratase contenha íntrons. As bactérias não contêm a maquinaria de processamento necessária para remover os íntrons, e, desse modo, a proteína correta não pode ser expressada a partir do gene. Para a expressão da maioria dos genes de mamíferos em células bacterianas, uma versão do cDNA do gene deve ser utilizada.

RESPOSTA 10-9

A. Falso. Sítios de restrição são encontrados aleatoriamente pelo genoma, tanto dentro como entre os genes.
B. Verdadeiro. O DNA tem uma carga negativa em cada fosfato, dando ao DNA uma carga negativa, como um todo.
C. Falso. Os clones isolados a partir de bibliotecas de cDNA não contêm sequências promotoras. Essas sequências não

são transcritas e, portanto, não fazem parte dos mRNAs que são utilizados como molde para produzir cDNAs.

D. Verdadeiro. Cada reação de polimerização produz DNA de fita dupla que deve, a cada ciclo, ser desnaturado para permitir que novos iniciadores hibridizem, de maneira que a fita de DNA possa ser copiada novamente.

E. Falso. A digestão do DNA genômico com nucleases de restrição que reconhecem sequências de quatro nucleotídeos produz fragmentos que têm *em média* 256 nucleotídeos de comprimento. Entretanto, o comprimento real dos fragmentos produzidos variará consideravelmente em ambos os lados da média.

F. Verdadeiro. A transcriptase reversa é necessária primeiro para copiar o mRNA em DNA de fita simples, e a DNA-polimerase é então necessária para sintetizar a segunda fita de DNA.

G. Verdadeiro. Utilizando um número suficiente de STRs, indivíduos podem ter uma "impressão digital" única (ver Figura 10-19).

H. Verdadeiro. Se as células do tecido não trancreverem o gene de interesse, ele não estará representado na biblioteca de cDNA preparada a partir desse tecido. Entretanto, ele estará representado em uma biblioteca genômica preparada a partir do mesmo tecido.

RESPOSTA 10-10

A. A sequência de DNA, da extremidade 5′ para a extremidade 3′, é lida iniciando-se na base do gel, onde os fragmentos menores de DNA migram. Cada banda resulta da incorporação do trifosfato de didesoxirribonucleosídeo apropriado, e, como esperado, não existem duas bandas que tenham a mesma mobilidade. Isso permite que se determine a sequência de DNA pela leitura das bandas na ordem rigorosa, iniciando-se na base do gel para cima e terminando o nucleotídeo correto de acordo com a canaleta que a banda está.

A sequência de nucleotídeos da fita superior (**Figura R10-10A**) foi obtida a partir da Figura Q10-10, e a fita inferior foi deduzida a partir das regras de complementaridade do pareamento de bases.

B. A sequência de DNA pode ser, então, traduzida em uma sequência de aminoácidos utilizando o código genético. Entretanto, existem duas fitas de DNA que podem ser transcritas em RNA e três possíveis fases de leitura para cada fita. Portanto, existem seis sequências de aminoácidos que, em princípio, podem ser codificadas por essa extensão de DNA. Das três fases de leitura possíveis a partir da fita superior, apenas uma não é interrompida por um códon de terminação (blocos *amarelos* na Figura R10-10B).

A partir da fita inferior, duas das três fases de leitura também têm códons de terminação (não mostrado). A terceira fase dá a seguinte sequência:

```
SerAlaLeuGlySerSerGluAsnArgProArgThrProAlaArgThrGlyCysProValIle
```

Não é possível, a partir dessas informações, dizer qual das duas "fases de leitura abertas" corresponde à proteína real codificada por essa extensão de DNA.

Qual experimento adicional poderia distinguir entre essas duas possibilidades?

RESPOSTA 10-11

A. A clivagem do DNA genômico humano com HaeIII geraria cerca de 11×10^6 fragmentos diferentes [= $3 \times 10^9/4^4$], com EcoRI cerca de 730.000 fragmentos diferentes [= $3 \times 10^9/4^6$] e com NotI, cerca de 46.000 fragmentos diferentes [$3 \times 10^9/4^8$]. Também existirão alguns fragmentos adicionais gerados porque os cromossomos maternos e paternos são muito similares, mas nunca idênticos na sequência de DNA.

B. Um conjunto de fragmentos de DNA que se sobrepõe será gerado. Bibliotecas construídas a partir dos conjuntos de fragmentos de genoma que se sobrepõem são preciosas, pois podem ser utilizadas para ordenar sequências clonadas com relação à sua ordem original no genoma e, dessa forma, obter a sequência de DNA de uma longa extensão de DNA (ver Figura 10-27).

RESPOSTA 10-12

Pela comparação das posições com os marcadores de tamanho, encontramos que o tratamento com EcoRI produz dois fragmentos, um de 4 kb e outro de 6 kb; o tratamento com NotI produz um fragmento de 10 kb, e o tratamento com EcoRI + NotI produz três fragmentos de 6 kb, 3 kb e 1 kb. Isso resulta em um comprimento total de 10 kb calculado como a soma dos fragmentos em cada canaleta. Assim, a molécula original de DNA deve ter 10 kb (10.000 pares de nucleotídeos) de comprimento. Como o tratamento com EcoRI produz um fragmento de 10 kb de comprimento, pode ser que o DNA original seja uma molécula de DNA sem sítios de corte para NotI. Contudo, podemos descartar essa possibilidade pelos resultados da digestão com EcoRI + NotI. Sabemos que a clivagem somente com EcoRI produz dois fragmentos, de 6 kb e 4 kb, e, na digestão dupla, esse fragmento de 4 kb é clivado por NotI em um fragmento de 3 kb e um de 1 kb. Portanto, o DNA contém um sítio de clivagem para NotI, e, por isso, ele deve ser circular, já que apenas um único fragmento de 10 kb é produzido quando ele é cortado somente com NotI. A ordenação dos sítios de clivagem sobre um DNA circular para originar os tamanhos de fragmentos apropriados produz o mapa ilustrado na **Figura R10-12**.

RESPOSTA 10-13

A. O código genético é degenerado e existe mais de um códon possível para cada aminoácido, com exceção do triptofano e da metionina. Dessa forma, para detectar uma sequência nucleotídica que codifica para a sequência de aminoácidos da proteína, várias moléculas de DNA devem ser sintetizadas e reunidas para assegurar que a mistura conterá uma molécula que pareie exatamente com sequência de DNA do gene. Para as três sequências peptídicas dadas nessa ques-

(A)
```
5'-TATAAACTGGACAACCAGTTCGAGCTGGTGTTCGTGGTCGGTTTTCAGAAGATCCTAACGCTGACG-3'
3'-ATATTTGACCTGTTGGTCAAGCTCGACCACAAGCACCAGCCAAAAGTCTTCTAGGATTGCGACTGC-5'
```

(B) 5′ Fita superior do DNA 3′
```
  TATAAACTGGACAACCAGTTCGAGCTGGTGTTCGTGGTCGGTTTTCAGAAGATCCTAACGCTGACG
1 LeuLysLeuGluAsnGlnPheGlnLeuValPheValValGlyPheGlnLysIleLeuThrLeuThr
2  IleAsnTrpThrThrSerSerSerTrpCysSerTrpSerValPheArgArgSer   Arg
3       ThrGlyGlnProValArgAlaGlyValArgGlyArgPheSerGluAspProAsnAlaAsp
```

Figura R10-10

Figura R10-12

tão, as seguintes sondas devem ser sintetizadas (bases alternativas na mesma posição são mostradas entre parênteses):

Peptídeo 1:

5'-TGGATGCA(C,T)CA(C,T)AA(A,G)-3'

Em virtude das três degenerações de duas vezes, você precisaria de oito (= 2^3) sequências de DNA diferentes na mistura.

Peptídeo 2:

5'-(T,C)T(G,A,T,C)(A,T)(G,C)(G,A,T,C)(A,C)G-(G,A,T,C)- (T,C)(G,A,T,C)(A,C)G(G,A,T,C) -3'

A mistura que representa a sequência do peptídeo nº 2 é muito mais complicada. Leu, Ser e Arg são, cada um, codificados por seis códons diferentes; desse modo, você precisaria sintetizar uma mistura de 7.776 (= 6^5) moléculas de DNA diferentes. Entretanto, isso não poderia ser feito simplesmente usando mais de um nucleotídeo diferente em qualquer uma das posições, porque as diferentes bases em cada códon não são independentes. (Ser, por exemplo, tem A ou T como primeira base do códon, G ou C como segunda base e G, A, T ou C como terceira base; entretanto, quando a primeira base é A, a segunda base é sempre G, e a terceira base poderá ser apenas T ou C.)

Peptídeo 3:

5'-TA(C,T)TT(C,T)GG(G,A,T,C)ATGCA(A,G) - 3'

Em virtude das degenerações de duas vezes e uma de quatro vezes, você precisaria de 32 (= $2^3 \times 4$) sequências diferentes na mistura.

Você, presumivelmente, usaria primeiro a sonda nº 1 para pesquisar a sua biblioteca por hibridização. Como existem apenas oito sequências de DNA possíveis, a proporção de uma sequência correta para as incorretas é maior, dando a você uma melhor chance de encontrar um clone que combine. A sonda nº 2 é praticamente sem uso, porque apenas 1/7.776 do DNA na mistura hibridizaria perfeitamente com o seu gene de interesse. Você poderia usar a sonda nº 3 para verificar se o clone que você obteve está correto. Quaisquer clones de bibliotecas que hibridizem com as sondas nº 1 e nº 3 provavelmente contenham o gene de interesse.

B. Saber que a sequência peptídica nº 3 contém o último aminoácido da proteína é uma informação valiosa porque diz que as outras duas sequências peptídicas devem estar antes dela, isto é, devem estar localizadas mais distantes em direção à extremidade N-terminal da proteína. O conhecimento dessa ordem é importante, porque iniciadores de DNA podem ser estendidos pela DNA-polimerase apenas a partir das suas extremidades 3'; por isso, as extremidades 3' dos dois iniciadores devem estar "frente a frente" durante a reação de amplificação por PCR (ver Figura 10-16). Um iniciador de PCR com base na sequência peptídica nº 3 deve, portanto, ser a sequência complementar da sonda nº 3 (de modo que a sua extremidade 3' corresponda ao primeiro nucleotídeo da sequência complementar ao códon Trp):

5'-(TC)TGCAT(G,A,T,C)CC(G,A)AA(G,A)TA-3'

Como antes, esse iniciador teria 32 sequências de DNA diferentes, das quais apenas uma combinaria perfeitamente com o gene. A sonda nº 1 poderia ser a sua escolha para o segundo iniciador. A sonda nº 2, novamente em virtude da sua alta degeneração, seria a escolha muito menos apropriada.

C. As extremidades do produto de amplificação final são derivadas dos iniciadores, que têm 15 nucleotídeos de comprimento cada um. Dessa forma, um segmento de 270 nucleotídeos do cDNA do gene foi amplificado. Isso codificará para 90 aminoácidos; a adição de aminoácidos codificados pelos iniciadores origina uma sequência que codifica para uma proteína de 100 aminoácidos. É improvável que isso represente o gene inteiro. Entretanto, para sua satisfação, você pode notar que CTATCACGCTTTAGG codifica para a sequência peptídica nº 2. Portanto, essa informação confirma que o seu produto de PCR na verdade codifica para um fragmento de uma proteína que você isolou originalmente.

RESPOSTA 10-14 Os produtos compreenderão um grande número de moléculas de DNA diferentes de fita simples, uma para cada nucleotídeo na sequência. Entretanto, cada molécula de DNA terá uma das quatro cores, dependendo de qual dos didesoxirribonucleotídeos terminou a reação de polimerização daquela cadeia. A separação por eletroforese em gel gerará uma escada de bandas, cada uma com um nucleotídeo distante da outra, e a sequência pode ser lida a partir da ordem das cores (**Figura R10-14**). O método descrito aqui forma a base para a estratégia do sequenciamento de DNA utilizada na maioria das máquinas de sequenciamento automatizadas (ver Figura 10-22).

Figura R10-14

RESPOSTA 10-15

A. Clones de cDNA não poderiam ser utilizados porque não existe sobreposição entre os clones de cDNA de genes adjacentes.

B. Tal sequência repetitiva de DNA pode confundir caminhadas cromossomais, porque a caminhada poderia parecer ramificar-se em várias direções diferentes de uma só vez. A estratégia geral para evitar esses problemas é utilizar clones genômicos que são suficientemente longos para sobrepassarem a sequência repetitiva de DNA.

RESPOSTA 10-16

A. As crianças 2 e 8 têm padrões idênticos de STR e, por isso, devem ser irmãos. As crianças 3 e 6 também têm padrões idênticos de STR e também devem ser gêmeos idênticos. Os outros dois grupos de gêmeos devem ser gêmeos fraternos, pois seus padrões STR não são idênticos. Gêmeos fraternos, como qualquer outro par de irmãos nascidos dos mesmos pais, terão aproximadamente metade do seu genoma em comum. Assim, aproximadamente metade do polimorfismo de STR em gêmeos fraternos será idêntico. Utilizando esse critério, você pode identificar as crianças 1 e 7 como gêmeos fraternos e as crianças 4 e 5 como gêmeos fraternos.

B. As crianças podem ser relacionadas com os seus pais ao se utilizar o mesmo tipo de análise dos polimorfismos de STR. Cada banda presente na análise de uma criança deveria ter

uma banda correspondente em um ou outro dos pais, e, em média, cada criança compartilhará metade dos seus polimorfismos com cada um dos pais. Assim, o grau de pareamento entre cada criança e cada um dos pais será aproximadamente o mesmo daquele entre os gêmeos fraternos.

RESPOSTA 10-17 Bactérias mutantes que não produzem a proteína do gelo provavelmente surgiram muitas vezes na natureza. Entretanto, as bactérias que produzem a proteína do gelo têm uma leve vantagem no crescimento sobre aquelas que não produzem; assim, seria difícil encontrar tais mutantes na natureza. A tecnologia do DNA recombinante torna esses mutantes muito mais fáceis de serem obtidos. Nesse caso, as consequências, tanto vantajosas como desvantajosas, de usar um organismo modificado geneticamente são quase indistinguíveis daquelas dos mutantes naturais. Cepas bacterianas e de leveduras têm sido selecionadas por séculos para características genéticas desejáveis que as tornem adequadas para aplicações em escala industrial, como a produção de queijo e de vinho. Entretanto, as possibilidades da tecnologia do DNA recombinante são infinitas, e, como com qualquer tecnologia, existe um risco limitado de consequências imprevistas. Entretanto, a experimentação com DNA recombinante é controlada, e os riscos de projetos individuais são cuidadosamente avaliados por bancas de críticos antes que as permissões sejam concedidas. Nosso conhecimento está tão avançado que as consequências de algumas alterações, como a interrupção de um gene bacteriano no exemplo citado, podem ser preditas com certeza razoável. Outras aplicações, como a terapia com genes da linhagem germinativa para corrigir doenças humanas, poderão ter muito mais consequências complexas e levarão muito mais anos de pesquisa e debates éticos para determinar se um tratamento desses poderá, finalmente, ser utilizado.

CAPÍTULO 11

RESPOSTA 11-1 A água é um líquido, e, portanto, as pontes de hidrogênio entre as moléculas de água não são estáticas, elas são continuamente formadas e rompidas por meio da agitação térmica. Quando uma molécula de água está próxima a uma molécula hidrofóbica, ela tem seus movimentos mais restritos e menos "vizinhos" com quem interagir, já que não pode formar pontes de hidrogênio na direção da molécula hidrofóbica. Desse modo, ela formará pontes de hidrogênio com um número mais limitado de moléculas nas proximidades. A ligação com menos parceiras resulta em uma estrutura mais ordenada da água, que representa a estrutura em arcabouço da Figura 11-9. Essa estrutura está relacionada com a estrutura do gelo, embora seja mais transiente, menos organizada e com uma rede menos extensa do que o menor dos cristais de gelo. A formação de qualquer estrutura organizada diminui a entropia do sistema (ver Capítulo 3), o que é energeticamente desfavorável.

RESPOSTA 11-2 (B) é a analogia correta para a disposição da bicamada lipídica, pois é a repulsão da água, e não as forças de atração entre moléculas lipídicas, que está envolvida. Caso as moléculas lipídicas formassem ligações umas com as outras, a bicamada lipídica seria menos fluida e poderia até se tornar rígida, dependendo da intensidade das interações.

RESPOSTA 11-3 A fluidez da bicamada é limitada a um plano: moléculas lipídicas podem difundir-se lateralmente, mas não podem mudar de uma monocamada para a outra. Tipos específicos de moléculas lipídicas inseridas em uma monocamada ali permanecem, a menos que sejam transferidas ativamente pela enzima flipase.

RESPOSTA 11-4 Tanto em α-hélices quanto em barris β, as ligações peptídicas polares da cadeia principal podem ser completamente protegidas do meio hidrofóbico da bicamada lipídica pelas cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos. Pontes de hidrogênio internas, entre as ligações peptídicas, estabilizam α-hélices e barris β.

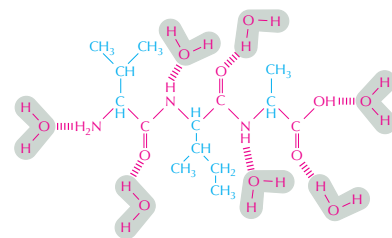
RESPOSTA 11-5 O grupo sulfato no SDS é carregado e, portanto, hidrofílico. Os grupos OH e C-O-C no Triton X-100 são polares; eles podem formar pontes de hidrogênio com a água e são, portanto, hidrofílicos. Ao contrário, as porções azuis das moléculas são cadeias hidrocarbonadas ou anéis aromáticos; nenhum deles pode formar pontes de hidrogênio com moléculas de água, sendo, portanto, hidrofóbicos (ver **Figura R11-5**).

Valina Isoleucina Alanina

Figura R11-5

RESPOSTA 11-6 α-Hélices geralmente são utilizadas nas proteínas para atravessar bicamadas lipídicas. Essas estruturas são boas para esse propósito, pois expõem cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos ao interior hidrofóbico da bicamada lipídica, mas mantêm as ligações peptídicas polares da cadeia principal longe da fase hidrofóbica (ver Figuras 11-22 a 11-25). Contudo, há outras formas, menos regulares, de enovelamento da cadeia polipeptídica que têm o mesmo efeito, como é demonstrado pela pequena volta no centro de reação fotossintética. Isso ilustra a importância da determinação de estruturas tridimensionais, que é conhecida apenas para poucas proteínas de membrana.

RESPOSTA 11-7 Algumas moléculas das duas proteínas transmembrana estão ancoradas a filamentos de espectrina do córtex celular. Essas moléculas não são livres para rotar ou difundir no plano da membrana. Há mais proteínas de membrana do que locais de ancoramento no córtex; dessa forma, algumas proteínas de membrana não são ancoradas e podem tanto rotar quanto difundir livremente no plano da membrana. De fato, medidas acerca da mobilidade de proteínas mostram que há duas populações diferentes de proteínas transmembrana, as que são ancoradas e as que são livres.

RESPOSTA 11-8 As diferentes maneiras pelas quais proteínas de membrana podem ter seus movimentos restritos são sumarizadas na Figura 11-33. A mobilidade de proteínas de membrana é drasticamente reduzida se elas estiverem ligadas

a outras proteínas como as do citoesqueleto ou da matriz extracelular. Algumas proteínas podem ser confinadas em domínios de membrana através de barreiras, como, por exemplo, as junções ocludentes. A fluidez da bicamada lipídica não é afetada significativamente pelo ancoramento de proteínas de membrana; as moléculas lipídicas fluem ao redor das proteínas de membrana ancoradas, como a água flui através dos pilares das pontes.

RESPOSTA 11-9 Todas afirmações estão corretas.

A, B, C, D. A bicamada lipídica é fluida porque as moléculas lipídicas podem realizar esses movimentos.

E. Glicolipídeos estão principalmente restritos à monocamada das membranas não voltada para o citosol. Alguns glicolipídeos específicos, como fosfatidilinositol (discutido no Capítulo 16), são encontrados na monocamada citosólica.

F. A redução das ligações duplas (por hidrogenação) permite que as moléculas de lipídeos fiquem mais empacotadas umas contra as outras, aumentando a viscosidade – ou seja, transformando óleo em margarina.

G. Exemplos incluem as enzimas envolvidas na sinalização (discutido no Capítulo 16).

H. Polissacarídeos são os principais constituintes do muco e do limo; o glicocálix, que é feito de polissacarídeos e oligossacarídeos, é um importante lubrificante, por exemplo, para células que delimitam vasos sanguíneos ou que circulam na corrente sanguínea.

RESPOSTA 11-10 Em um líquido bidimensional, as moléculas são livres para se moverem apenas em um plano; em um líquido normal, as moléculas podem mover-se nas três dimensões.

RESPOSTA 11-11

A. Você teria um detergente. O diâmetro da cabeça do lipídeo seria muito maior do que a cauda hidrocarbonada, e a forma da molécula seria um cone, e não um cilindro; as moléculas se agregariam formando micelas, e não bicamadas.

B. As bicamadas lipídicas formadas seriam muito mais fluidas. As bicamadas também seriam menos estáveis, pois as caudas hidrocarbonadas mais curtas seriam menos hidrofóbicas, e as forças que induzem a formação da bicamada estariam reduzidas.

C. As bicamadas lipídicas formadas seriam muito menos fluidas. Enquanto uma bicamada lipídica normal tem a viscosidade de azeite de oliva, uma bicamada composta pelos mesmos lipídeos, porém com caudas hidrocarbonadas saturadas, teria a consistência da gordura do *bacon*.

D. As bicamadas lipídicas formadas seriam muito mais fluidas. Como o arranjo dos lipídeos seria menos compacto, haveria mais lacunas, e a bicamada seria mais permeável a pequenas moléculas solúveis em água.

E. Se assumirmos que as moléculas lipídicas estão misturadas, a fluidez da membrana não será modificada. Nessas bicamadas, entretanto, as moléculas lipídicas saturadas tendem a se agregar, pois podem empacotar-se muito mais eficazmente umas com as outras, formando assim bolsões de fluidez reduzida. A bicamada não teria então propriedades uniformes na sua superfície. Essa segregação não ocorre em células normais, pois cada cabeça hidrofílica tem uma cauda saturada e uma cauda insaturada ligadas a ela.

F. As bicamadas lipídicas formadas não teriam suas propriedades modificadas. Cada molécula lipídica agora atravessaria toda extensão da membrana, com cada uma das "cabeças" em um dos lados da membrana. Essas moléculas lipídicas são encontradas nas membranas de bactérias termofílicas, que podem habitar águas com temperaturas próximas ao ponto de ebulição. Essas bicamadas não se desfazem em temperaturas elevadas, como geralmente ocorre com as membranas, pois a bicamada original é covalentemente ligada como uma única membrana.

RESPOSTA 11-12 As moléculas lipídicas têm formato ligeiramente cilíndrico. As moléculas de detergente têm formato cônico. Uma molécula de lipídeo com apenas uma cauda hidrocarbonada, por exemplo, seria um detergente. Para converter um lipídeo em um detergente, seria necessário aumentar sua cabeça hidrofílica e remover uma de suas caudas de modo que possa formar micelas. Moléculas de detergente também costumam ter caudas hidrocarbonadas mais curtas do que as moléculas lipídicas. Isso os torna ligeiramente solúveis em água, e as moléculas de detergente podem deixar e retornar às micelas em meios aquosos. Por esse motivo, algumas moléculas monoméricas de detergente sempre estão presentes em soluções aquosas, podendo permear bicamadas lipídicas e solubilizar proteínas de membrana (ver Figura 11-27).

RESPOSTA 11-13 Quando alinhadas, há aproximadamente 4.000 moléculas lipídicas (cada uma com 0,5 nm de diâmetro) entre as duas pontas da célula bacteriana. Dessa forma, se uma molécula situada em uma das pontas começar a mover-se em direção à outra, trocando de lugar com cada uma das moléculas vizinhas a cada 10^{-7} segundos, ela levaria apenas 4×10^{-4} segundos (= 4.000×10^{-7} segundos) para alcançar a outra ponta da bactéria. No entanto, a molécula lipídica não se desloca em linha reta, e sim em movimentos aleatórios; então, ela leva um tempo consideravelmente maior (1 segundo) para alcançar a outra ponta. Se uma bola de tênis de mesa de 4 cm de diâmetro trocasse de lugar com as bolhas adjacentes a cada 10^{-7} segundos, ela viajaria a uma velocidade de 1.440.000 km/h (= 4 cm/10^{-7} segundos). Se seus movimentos ocorrerem em apenas uma direção, ela alcançará a outra parede da sala em $1,5 \times 10^{-5}$ segundos; em movimentos aleatórios, o tempo seria maior (aproximadamente 2 ms).

RESPOSTA 11-14 Proteínas de membrana ancoram a bicamada lipídica ao citoesqueleto, reforçando a membrana plasmática de forma que essa aguente as forças sobre ela quando uma hemácia for bombeada através de pequenos vasos sanguíneos. Proteínas de membrana também transportam nutrientes e íons através da membrana plasmática.

RESPOSTA 11-15 As faces hidrofóbicas das cinco α-hélices transmembrana oriundas das diferentes subunidades estarão agregadas formando um poro que atravessa a bicamada lipídica e é delimitado pelas cadeias laterais dos aminoácidos hidrofílicos (**Figura R11-15**). Íons podem atravessar esse poro. As cadeias laterais hidrofóbicas interagem com as caudas hidrofóbicas dos lipídeos da bicamada.

RESPOSTA 11-16 Existem cerca de 100 moléculas lipídicas (fosfolipídeo + colesterol) para cada molécula proteica na membrana [= $(2 \times 50.000)/(1/800 + 1/256)$]. Uma proporção similar é encontrada em várias membranas celulares.

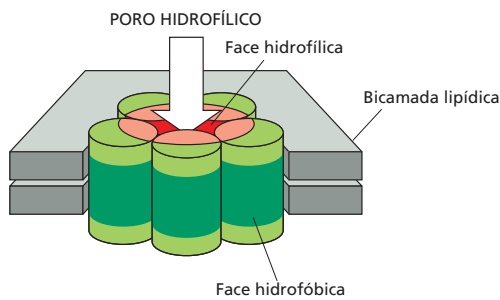



Figura R11-15

RESPOSTA 11-17 A fusão de membranas não altera a orientação das proteínas de membrana com seus marcadores ligados: a porção de cada proteína transmembrana que é exposta ao citosol permanece sempre voltada para o citosol, e a porção exposta ao meio externo permanece voltada para fora (**Figura R11-17**). A uma temperatura de 0 °C, a fluidez da membrana é reduzida, e a mistura das proteínas de membrana é significativamente retardada.

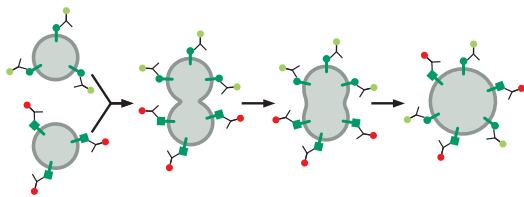



Figura R11-17

RESPOSTA 11-18 A exposição de uma cadeia lateral de aminoácido hidrofóbico à água é energeticamente desfavorável. Há duas maneiras de sequestrar essas cadeias laterais da água para atingir um estado energeticamente mais favorável. Esses aminoácidos podem formar segmentos proteicos transmembrana na bicamada lipídica. Isso requer cerca de 20 aminoácidos sequenciais em uma cadeia polipeptídica. A outra forma é manter esses aminoácidos no interior da cadeia polipeptídica enovelada. Essa é uma das maiores forças que mantém uma cadeia polipeptídica como uma única estrutura tridimensional. Nos dois casos, as forças hidrofóbicas na bicamada lipídica ou no interior da proteína se baseiam nos mesmos princípios.

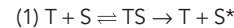
RESPOSTA 11-19 (A) Peixes antárticos vivem em temperaturas abaixo de zero e são animais de sangue frio. Para manter a fluidez das membranas, nessas temperaturas, eles possuem uma alta porcentagem de fosfolipídeos insaturados.

RESPOSTA 11-20 A sequência B é a que mais provavelmente formará uma hélice transmembrana. Essa sequência é composta principalmente por aminoácidos hidrofóbicos e pode, portanto, estar integrada à bicamada lipídica de forma estável. A sequência A contém muitos aminoácidos polares (S, T, N, Q), e a sequência C possui muitos aminoácidos carregados (K, R, H, E, D) que seriam energeticamente desfavoráveis no interior hidrofóbico de uma bicamada lipídica.

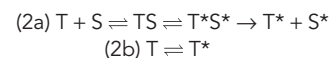
CAPÍTULO 12

RESPOSTA 12-1

A. O movimento de moléculas mediado por um transportador pode ser descrito por uma equação estritamente análoga:

$$(1)\ T + S \rightleftharpoons TS \rightarrow T + S^*$$

onde S é o soluto, S* é o soluto no outro lado da membrana (isto é, embora ainda seja a mesma molécula, ela agora se localiza em um ambiente diferente), e T é o transportador.

B. Essa equação é útil porque descreve uma etapa de ligação, a qual é seguida de uma etapa de transferência. O tratamento matemático dessa equação seria muito similar ao descrito para as enzimas (ver Figura 3-24). Assim, os transportadores são caracterizados por um valor de K_M que descreve sua afinidade por um soluto e um valor de $V_{máx}$ que descreve sua taxa máxima de transferência. Para ser mais preciso, a mudança conformacional do transportador poderia ser incluída no esquema de reação

$$(2a)\ T + S \rightleftharpoons TS \rightleftharpoons T^*S^* \rightarrow T^* + S^*$$
$$(2b)\ T \rightleftharpoons T^*$$

onde T* é o transportador após a mudança conformacional que expõe seu sítio de ligação de soluto no outro lado da membrana. Esse cálculo requer uma segunda equação (2b) que permite ao transportador retornar à sua conformação inicial.

C. As equações não descrevem o comportamento dos canais porque os solutos que atravessam os canais não se ligam a eles do mesmo modo que um substrato se liga a uma enzima.

RESPOSTA 12-2 Se a bomba de Na^+-K^+ não estiver funcionando em sua plena capacidade porque está parcialmente inibida por ouabaína ou digitalina, ela gera um gradiente eletroquímico de Na^+ que é menos elevado do que aquele em células não tratadas. Consequentemente, o antiporte de Ca^{2+}-Na^+ funciona com menos eficácia, e o Ca^{2+} é removido da célula mais lentamente. Quando o próximo ciclo de contração muscular começa, ainda há um nível elevado de Ca^{2+} restante no citosol. Portanto, a entrada do mesmo número de íons Ca^{2+} na célula leva a uma concentração de Ca^{2+} mais alta do que em células não tratadas, o que, por sua vez, leva a uma contração mais forte e de duração mais longa. Como a bomba de Na^+-K^+ executa funções essenciais em todas as células animais, tanto para manter o balanço osmótico como para gerar o gradiente de Na^+ usado para abastecer muitos transportadores, os fármacos são venenos mortais em concentrações mais altas.

RESPOSTA 12-3

A. As propriedades definem um simporte.

B. Nenhuma propriedade adicional precisa ser especificada. A característica importante que propicia o acoplamento dos dois solutos é que a proteína não pode alterar sua conformação se somente um dos dois solutos estiver ligado. O soluto B, que está direcionando o transporte do soluto A, está em excesso no lado da membrana a partir do qual o transporte inicia e ocupa seu sítio de ligação na maior parte do tempo. Nesse estado, o transportador, impedido de alterar sua conformação, aguarda até que uma molécula do soluto A se

ligue de vez em quando. Estando ambos os sítios de ligação ocupados, o transportador altera a conformação. Agora exposto ao outro lado da membrana, o sítio de ligação do soluto B está na maior parte vazio, porque há pouco dele na solução nesse lado da membrana. Embora o sítio de ligação do soluto A esteja sendo agora ocupado com mais frequência, o transportador pode novamente se alterar somente após o soluto A também ser descarregado.

C. Um antiporte poderia ser similarmente construído como uma proteína transmembrânica com as seguintes propriedades. Ele possui dois sítios de ligação, um para o soluto A e um para o soluto B. A proteína pode sofrer uma mudança conformacional, alterando-se entre dois estados: ou ambos os sítios de ligação estão expostos exclusivamente em um lado da membrana, ou ambos os sítios de ligação estão expostos exclusivamente no outro lado da membrana. A proteína pode alterar-se entre os dois estados conformacionais somente se um sítio de ligação estiver ocupado, mas não pode alterar-se ambos os sítios de ligação estiverem ocupados, ou se ambos os sítios de ligação estiverem vazios.

Note que essas regras fornecem um modelo alternativo àquele mostrado na Figura 12-17. Assim, há dois modos possíveis de acoplar o transporte de dois solutos: (1) proporcionar sítios cooperativos de ligação de soluto e permitir que a bomba se altere aleatoriamente entre os dois estados, como mostrado na Figura 12-16, ou (2) permitir a ligação independente de ambos os solutos e condicionar a alteração entre os dois estados à ocupação dos sítios de ligação. Uma vez que a estrutura de um transportador acoplado ainda não foi determinada, não sabemos qual dos dois mecanismos essas bombas usam.

RESPOSTA 12-4 Cada um dos picos retangulares corresponde à abertura de um único canal que permite a passagem de uma corrente pequena. Percebe-se a partir do registro que os canais presentes no fragmento de membrana se abrem e se fecham frequentemente. Cada canal permanece aberto por um período muito curto e um tanto variável, cerca de 10 milissegundos em média. Quando abertos, os canais permitem que uma corrente pequena com uma amplitude única (4 pA; um picoampére = 10^{-12} A) passe. Em um exemplo, a corrente dobra, indicando que dois canais no mesmo fragmento de membrana se abriram simultaneamente.

Se a acetilcolina for omitida ou for adicionada à solução do lado de fora da pipeta, você mediria somente a corrente da linha de base. A acetilcolina deve ligar-se à porção extracelular das moléculas do receptor de acetilcolina para permitir que o canal se abra, e, no fragmento de membrana mostrado na Figura 12-23, o lado citoplasmático da membrana está exposto à solução do lado de fora do microeletrodo.

RESPOSTA 12-5 O potencial de equilíbrio de K^+ é –90 mV [= 62 mV $\log_{10}$ (5 mM/140 mM)], e o de Na^+ é +72 mV [= 62 mV $\log_{10}$ (145 mM/10 mM)]. Os canais de escoamento de K^+ na membrana plasmática de uma célula em repouso permitem que o K^+ chegue ao equilíbrio; o potencial de membrana da célula é, portanto, próximo a –90 mV. Quando os canais de Na^+ se abrem, o Na^+ se dirige rapidamente para dentro, e, por consequência, o potencial de membrana inverte sua polaridade a um valor mais perto de +72 mV, o valor de equilíbrio para o Na^+. Após o fechamento dos canais de Na^+, os canais de escoamento de K^+ permitem que o K^+, agora não mais em equilíbrio, saia da célula até que o potencial de membrana seja restaurado ao valor de equilíbrio para o K^+, cerca de –90 mV.

RESPOSTA 12-6 Quando o potencial de membrana de repouso de um axônio cai abaixo de um valor limiar, os canais de Na^+ controlados por voltagem na vizinhança imediata se abrem e permitem um influxo de Na^+. Isso despolariza a membrana ainda mais, fazendo com que mais canais distantes de Na^+ controlados por voltagem também se abram. Cria-se uma onda de despolarização que se propaga rapidamente ao longo do axônio, denominada potencial de ação. Como os canais de Na^+ se tornam inativados logo depois que se abrem, o fluxo de K^+ através dos canais de K^+ controlados por voltagem e dos canais de escoamento de K^+ é capaz de restaurar o potencial de membrana de repouso original rapidamente após o potencial de ação ter passado.

RESPOSTA 12-7 Se o número de receptores funcionais de acetilcolina for reduzido pelos anticorpos, o neurotransmissor (acetilcolina) que é liberado a partir dos terminais nervosos não pode (ou pode só fracamente) estimular a contração do músculo.

RESPOSTA 12-8 Por analogia à bomba de Na^+-K^+ mostrada na Figura 12-11, o ATP poderia ser hidrolisado e doar um grupo fosfato ao transportador quando – e somente quando – ele tiver o soluto ligado na face "de dentro" da membrana (etapa 1 → 2). A ligação do fosfato desencadearia uma mudança conformacional imediata (etapa 2 → 3), capturando, assim, o soluto e expondo-o ao lado "de fora". O fosfato seria removido da proteína quando – e somente quando – o soluto tivesse se dissociado, sendo que o transportador não fosforilado, agora vazio, se alteraria novamente à posição inicial (etapa 3 → 4) (**Figura R12-8**).

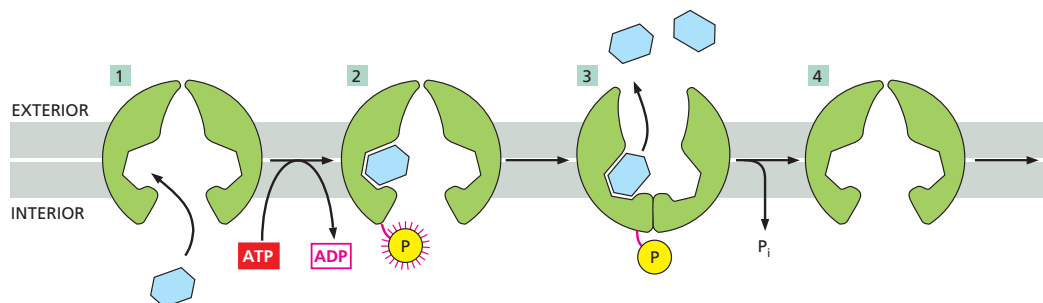



Figura R12-8

RESPOSTA 12-9

A. Falso. A membrana plasmática contém proteínas que conferem permeabilidade seletiva a muitas moléculas carregadas. Em contrapartida, uma bicamada lipídica pura desprovida de proteínas é altamente impermeável a todas as moléculas carregadas.
B. Falso. Os canais não se ligam ao soluto que os atravessa. A seletividade de um canal é obtida pelo tamanho do poro interno e por regiões carregadas na entrada do poro que atraem ou repelem íons de carga apropriada.
C. Falso. Os transportadores são mais lentos. Eles possuem propriedades similares às enzimas, isto é, se ligam a solutos e necessitam sofrer mudanças conformacionais durante seu ciclo funcional. Isso limita a taxa máxima de transporte a cerca de 1.000 moléculas de soluto por segundo, ao passo que os canais podem dar passagem a até 1.000.000 de moléculas de soluto por segundo.
D. Verdadeiro. A bacteriorrodopsina de algumas bactérias fotossintéticas desloca H^+ usando a energia capturada da luz visível.
E. Verdadeiro. A maioria das células animais contém canais de escoamento de K^+ em suas membranas plasmáticas que estão predominantemente abertos. A concentração de K^+ dentro da célula ainda permanece mais alta do que fora, porque o potencial de membrana é negativo e, portanto, inibe o escape do K^+ positivamente carregado. O K^+ também é continuamente bombeado para dentro da célula pela bomba de Na^+-K^+.
F. Falso. Um simporte se liga a dois solutos diferentes no mesmo lado da membrana. Inverter sua posição não o transformaria em um antiporte, o qual também deve ligar-se a solutos diferentes, mas em lados opostos da membrana.
G. Falso. O pico de um potencial de ação corresponde a uma alteração transitória do potencial de membrana de um valor negativo a um positivo. O influxo de Na^+ faz com que o potencial de membrana primeiro se mova em direção a zero e então se inverta, tornando a célula positivamente carregada em seu interior. Finalmente, o potencial de repouso é restaurado por um efluxo de K^+ através de canais de K^+ controlados por voltagem e canais de escoamento de K^+.

RESPOSTA 12-10 As permeabilidades são: N_2 (pequeno e apolar) > etanol (pequeno e ligeiramente polar) > água (pequena e polar) > glicose (grande e polar) > Ca^{2+} (pequeno e carregado) > RNA (muito grande e carregado).

RESPOSTA 12-11

A. Ambos acoplam o movimento de dois solutos diferentes através da membrana. Os simportes transportam ambos os solutos na mesma direção, ao passo que os antiportes transportam os solutos em direções opostas.
B. Ambos são mediados por proteínas de transporte de membrana. O transporte passivo de um soluto ocorre "morro abaixo" (favoravelmente), na direção de seu gradiente de concentração ou eletroquímico, ao passo que o transporte ativo ocorre "morro acima" (desfavoravelmente) e, portanto, necessita de uma fonte de energia. O transporte ativo pode ser mediado por transportadores, mas não por canais, ao passo que o transporte passivo pode ser mediado por ambos os tipos.
C. Ambos os termos descrevem as mudanças energéticas envolvidas no movimento de um íon de um lado ao outro de uma membrana. O potencial de membrana se refere à mudança de energia elétrica; o gradiente eletroquímico é um composto dessa mudança de energia elétrica e da mudança de energia química associada ao movimento entre uma região de alta concentração e uma região de baixa concentração. O potencial de membrana é definido independentemente da escolha do íon, ao passo que um gradiente eletroquímico depende do gradiente de concentração do soluto iônico específico e é, portanto, um parâmetro soluto-específico.
D. Uma bomba é um transportador especializado que usa energia para transportar desfavoravelmente um soluto contra um gradiente eletroquímico.
E. Os dois transmitem sinais por meio de atividade elétrica. As linhas são feitas de cobre, os axônios, não. O sinal que passa ao longo de um axônio não diminui de força, porque é autoamplificador, ao passo que o sinal em uma linha diminui ao longo da distância (pelo escape de corrente através do revestimento isolante).
F. Ambos afetam a pressão osmótica da célula. Um íon é um soluto que porta uma carga.

RESPOSTA 12-12 Uma ponte permite a passagem, em sucessão constante, de veículos sobre um rio; a entrada pode ser projetada para excluir, por exemplo, caminhões muito grandes e pode ser intermitentemente fechada ao tráfego por um portão. Em analogia, os canais permitem o fluxo, em sucessão controlada por portões, de íons através da membrana, impondo restrições de tamanho e carga.

Uma balsa, em contrapartida, carrega veículos de uma margem do rio e, então, após o movimento da própria balsa, descarrega-os do outro lado do rio. Esse processo é mais lento. Durante o carregamento, veículos específicos podem ser selecionados da fila de espera porque se acomodam particularmente bem no deque de carros. Em analogia, os transportadores se ligam a solutos de um lado da membrana e, então, após um movimento conformacional, liberam-nos do outro lado. A ligação específica leva à seleção das moléculas que serão transportadas. Como no caso do transporte acoplado, às vezes você tem de aguardar até que a balsa esteja cheia antes de poder ir.

RESPOSTA 12-13 A acetilcolina está sendo transportada para dentro das vesículas por um antiporte de H^+-acetilcolina na membrana da vesícula. O gradiente de H^+ que direciona a captação é gerado por uma bomba de H^+ movida por ATP na membrana da vesícula, a qual bombeia H^+ para dentro da vesícula (por isso a dependência da reação de ATP). A elevação do pH da solução que circunda as vesículas aumenta o gradiente de H^+: em um pH elevado, há menos íons H^+ na solução no exterior das vesículas, ao passo que o número no interior permanece o mesmo. Isso explica o aumento observado da taxa de captação.

RESPOSTA 12-14 O gradiente de voltagem através da membrana é cerca de 150.000 V/cm. Esse campo elétrico extremamente potente está próximo do limite em que os materiais isolantes – como a bicamada lipídica – se desintegram e deixam de funcionar como isolantes. O campo grande corresponde à grande quantidade de energia que pode ser armazenada nos gradientes elétricos através da membrana, assim como às forças elétricas extremas que as proteínas podem experimentar em uma membrana. Uma voltagem de 150.000 V descarregaria instantaneamente em um arco através de um espaço de 1 cm de largura (ou seja, o ar seria um isolante insuficiente para essa força de campo).

RESPOSTA 12-15

A. Nada. O ATP é necessário para impulsionar a bomba de Na^+-K^+.

B. O ATP se torna hidrolisado, e o Na^+ é bombeado para dentro das vesículas, gerando um gradiente de concentração de Na^+ através da membrana. Ao mesmo tempo, o K^+ é bombeado para fora das vesículas, gerando um gradiente de concentração de K^+ de polaridade oposta. Quando todo o K^+ tivesse sido bombeado para fora da vesícula ou o ATP se esgotasse, a bomba pararia.

C. A bomba de Na^+-K^+ passaria pelos estados 1, 2 e 3 da Figura 12-11. Contudo, como todas as etapas de reação devem ocorrer estritamente em sequência, a desfosforilação e a alteração de conformação não podem ocorrer na ausência de K^+. Portanto, a bomba de Na^+-K^+ ficará emperrada no estado fosforilado, aguardando indefinidamente por um íon potássio. O número de íons sódio transportados seria muito pequeno, porque cada molécula da bomba teria funcionado somente uma única vez.

Experimentos similares, em que se excluíam íons individuais e se analisavam as consequências, foram usados para determinar a sequência de etapas por meio da qual a bomba de Na^+-K^+ funciona.

D. O ATP se tornaria hidrolisado, e o Na^+ e o K^+ seriam bombeados através da membrana, como descrito no cenário (B). Contudo, as moléculas da bomba que se situam na membrana na orientação reversa seriam completamente inativas (isto é, elas não bombeariam íons na direção oposta – como se poderia erroneamente supor), porque o ATP não teria acesso ao sítio dessas moléculas onde a fosforilação ocorre. Esse sítio está normalmente exposto ao citosol. O ATP é altamente carregado e não pode cruzar as membranas sem a ajuda de transportadores específicos.

E. O ATP se torna hidrolisado, e o Na^+ e o K^+ são bombeados através da membrana, como descrito no cenário (B). Contudo, o K^+ imediatamente flui de volta para dentro das vesículas através dos canais de escoamento de K^+. O K^+ se move a favor do gradiente de concentração de K^+ formado pela ação da bomba de Na^+-K^+. Com cada K^+ que se move para dentro da vesícula através do canal de escoamento, uma carga positiva é movida através da membrana, estabelecendo um potencial de membrana que é positivo no interior das vesículas. Finalmente, o K^+ cessará de fluir através dos canais de escoamento quando o potencial de membrana balancear o gradiente de concentração. O cenário descrito aqui é uma ligeira simplificação: a bomba de Na^+-K^+ das células de mamíferos move três íons sódio para fora das células para cada dois íons potássio que ela bombeia para dentro da célula, direcionando, desse modo, uma corrente elétrica através da membrana e dando uma pequena contribuição adicional ao potencial de membrana de repouso (o qual, portanto, corresponde só aproximadamente a um estado de equilíbrio para o K^+ que se move via os canais de escoamento de K^+).

RESPOSTA 12-16 Os canais iônicos podem ser controlados por ligante, por voltagem ou mecanicamente.

RESPOSTA 12-17 A célula possui um volume de 10^{-12} litros (= 10^{-15} m^3) e, assim, contém 6×10^4 íons cálcio (= 6×10^{23} moléculas/mol $\times$ 100 $\times$ 10^{-9} moles/litro $\times$ 10^{-12} litros). Portanto, para elevar a concentração intracelular de Ca^{2+} cinquenta vezes, outros 2.940.000 íons cálcio têm de entrar na célula (note que, na concentração de 5 μM, há 3×10^6 íons na célula, dos quais 60.000 já estão presentes antes de os canais serem abertos). Como cada um dos 1.000 canais permite a passagem de 10^6 íons por segundo, cada canal tem de permanecer aberto por somente 3 milissegundos.

RESPOSTA 12-18 As células animais direcionam a maioria dos processos de transporte através da membrana plasmática com o gradiente eletroquímico de Na^+. O ATP é necessário para abastecer a bomba de Na^+-K^+, a fim de que o gradiente de Na^+ seja mantido.

RESPOSTA 12-19

A. Se o H^+ for bombeado através da membrana para dentro dos endossomos, surge um gradiente eletroquímico de H^+ – composto tanto de um potencial elétrico como de um gradiente de concentração, sendo o interior da vesícula positivo. Esses dois componentes aumentam a energia que é armazenada no gradiente e que deve ser fornecida para gerá-lo. Portanto, o gradiente eletroquímico limitará a transferência de mais H^+. Contudo, se a membrana também contiver canais de Cl^-, o Cl^- negativamente carregado fluirá para dentro dos endossomos e diminuirá o potencial elétrico. Por isso, torna-se energeticamente menos dispendioso bombear mais H^+ através da membrana, sendo que o interior dos endossomos pode tornar-se mais ácido.

B. Sim. Como explicado em (A), um pouco de acidificação ainda ocorreria em sua ausência.

RESPOSTA 12-20

A. Ver **Figura R12-20A**.

B. As taxas de transporte do composto A são proporcionais à sua concentração, indicando que o composto A pode difun-

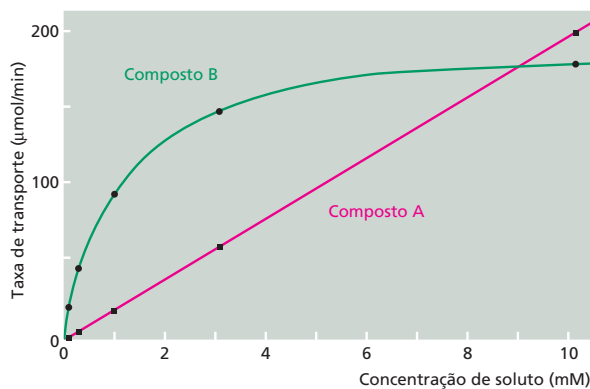
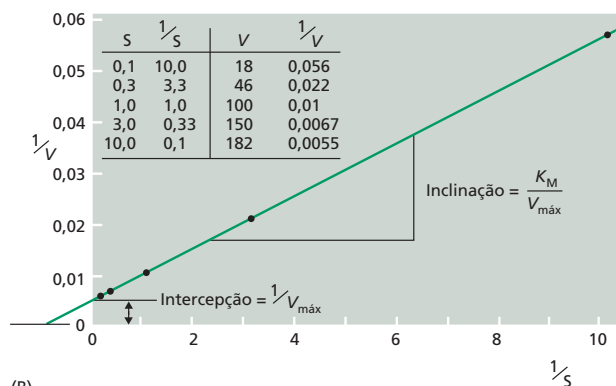



Figura R12-20

dir-se através das membranas por conta própria. É provável que o composto A seja o etanol, porque ele é uma molécula pequena e relativamente apolar que pode difundir-se de maneira rápida através da bicamada lipídica.

Por outro lado, as taxas de transporte do composto B se saturam em concentrações altas, indicando que o composto B é transportado através da membrana por algum tipo de proteína de transporte de membrana. As taxas de transporte não podem aumentar além de uma taxa máxima na qual essa proteína pode funcionar. É provável que o composto B seja o acetato, porque ele é uma molécula carregada que não poderia cruzar a membrana sem a ajuda de uma proteína de transporte de membrana.

C. Para o etanol, medimos uma relação linear entre a concentração e a taxa de transporte. Assim, em 0,5 mM, a taxa de transporte seria 10 μmol/min, e, em 100 mM, a taxa de transporte seria 2 μmol/min.

Para o movimento mediado por transportador do acetato, a relação entre concentração, S e taxa de transporte pode ser descrita pela equação de Michaelis-Menten, a qual descreve reações enzimáticas simples:

$$(1) \quad \text{taxa de transporte} = V_{máx} \times S/[K_M + S]$$

Recorde, do Capítulo 3 (ver Questão 3-20, p. 116), que, para determinar $V_{máx}$ e K_M, usa-se um artifício no qual a equação de Michaelis-Menten é transformada, de modo que é possível representar graficamente os dados como uma linha reta. Uma transformação simples gera

$$(2) \quad \mathbf{1/taxa} = (K_M/V_{máx})\,(\mathbf{1/S}) + 1/V_{máx}$$

(isto é, uma equação da forma $\boldsymbol{y} = a\boldsymbol{x} + b$)

O cálculo de 1/taxa e 1/S para os dados fornecidos, plotados em um novo gráfico, como na Figura R12-20B, dá uma linha reta. O K_M (= 1,0 mM) e o $V_{máx}$ (= 200 μmol/min) são determinados a partir da intercepção da linha com o eixo *y* ($1/V_{máx}$) e a partir de sua inclinação ($K_M/V_{máx}$). O conhecimento dos valores de K_M e $V_{máx}$ permite calcular as taxas de transporte para 0,5 mM e 100 mM de acetato usando a equação (1). Os resultados são 67 μmol/min e 198 μmol/min, respectivamente.

RESPOSTA 12-21 O potencial de membrana e a alta concentração extracelular de Na^+ propiciam uma grande força motora eletroquímica e um grande reservatório de íons Na^+, de modo que a maior parte dos íons Na^+ entra na célula quando os receptores de acetilcolina se abrem. Os íons Ca^{2+} também entrarão na célula, mas seu influxo é muito mais limitado em virtude da sua concentração extracelular mais baixa. (A maioria do Ca^{2+} que entra no citosol após a ativação muscular é liberada a partir de estoques intracelulares, como discutiremos no Capítulo 17). Em virtude da sua alta concentração intracelular e da direção oposta do potencial de membrana, os íons K^+ já estão próximos do equilíbrio ao longo da membrana. Por isso, haverá pouco, se houver, movimento de íons K^+ após a abertura de um canal de cátion.

RESPOSTA 12-22 A diversidade dos canais iônicos controlados por neurotransmissor é algo bom para a indústria farmacêutica, visto que há a possibilidade de desenvolvimento de novas medicações específicas para cada tipo de canal. Cada um dos diversos subtipos desses canais é expresso em um conjunto limitado de neurônios. Tal variação limitada de expressão torna possível, em princípio, descobrir ou projetar novos fármacos que afetam subtipos específicos de receptores presentes em um conjunto selecionado de neurônios, mirando, assim, funções cerebrais específicas com maior especificidade.

CAPÍTULO 13

RESPOSTA 13-1 Para manter a glicólise em andamento, as células precisam regenerar NAD^+ a partir de NADH. Não há um modo eficiente de fazê-lo sem a fermentação. Na ausência de NAD^+ regenerada, a etapa 6 da glicólise (a oxidação do gliceraldeído 3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato (Painel 13-1, p. 430-431) não poderia ocorrer, e o produto gliceraldeído 3-fosfato se acumularia. O mesmo aconteceria em células incapazes de produzir piruvato ou etanol: nenhuma seria capaz de regenerar NAD^+, e dessa forma a glicólise seria bloqueada na mesma etapa.

RESPOSTA 13-2 O arseniato no lugar de fosfato é incorporado na etapa 6 da glicólise para formar 1-arseno-3-fosfoglicerato (**Figura R13-2**). Por causa de sua sensibilidade à hidrólise em água, a ligação de alta energia é destruída antes que a molécula que a contém possa difundir-se para alcançar a próxima enzima. O produto da hidrólise, 3-fosfoglicerato, é o mesmo produto normalmente formado na etapa 7 pela ação da fosfoglicerato-cinase. Contudo, uma vez que a hidrólise ocorre não enzimaticamente, a energia liberada pela quebra da ligação de alta energia não pode ser capturada para gerar ATP. Na Figura 13-6, portanto, a reação correspondente à apontada pela seta ainda ocorreria, porém a força propulsora que proporciona o acoplamento à síntese de ATP está faltando. O arseniato desperdiça energia metabólica pelo desacoplamento de muitas reações de transferência de fosfato pelo mesmo mecanismo, o que é a razão de ser tão venenoso.

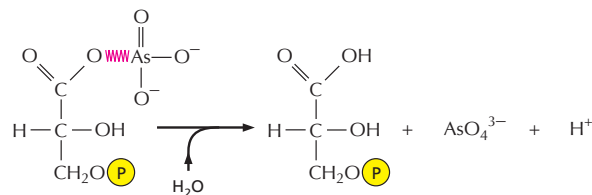



Figura R13-2

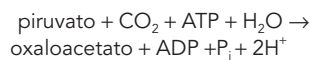
RESPOSTA 13-3 A oxidação dos ácidos graxos quebra a cadeia de carbono em duas unidades de dois carbono (grupos acetila) que se tornam anexadas à CoA. De modo inverso, durante a biogênese, os ácidos graxos são construídos pela ligação de grupos acetila. A maioria dos ácidos graxos, portanto, possui um número par de átomos de carbono.

RESPOSTA 13-4 Uma vez que a função do ciclo do ácido cítrico é capturar a energia liberada durante a oxidação, é vantajoso quebrar a reação total em tantas etapas quanto possível (ver Figura 13-1). Usando um composto de dois carbonos, a química disponível seria muito mais limitada, e seria impossível gerar tantos intermediários.

RESPOSTA 13-5 É verdade que os átomos de oxigênio são restituídos como parte do CO_2 à atmosfera. O CO_2 liberado das células, entretanto, não contém aqueles átomos específicos

de oxigênio que foram consumidos como parte da reação de fosforilação oxidativa e convertidos em água. Isso poderia ser mostrado diretamente pela incubação de células vivas em uma atmosfera que contenha oxigênio molecular e um isótopo diferente, ^{18}O, no lugar do naturalmente abundante isótopo, ^{16}O. Em um experimento como esse se verificaria que todo o CO_2 liberado pela célula contém apenas ^{16}O. Portanto, os átomos de oxigênio nas moléculas de CO_2 liberadas não vêm diretamente da atmosfera, mas de moléculas orgânicas que a célula primeiramente produziu e então oxidou como combustível (ver Painel 13-2, p. 442-443).

RESPOSTA 13-6 O ciclo continua, pois os intermediários são reabastecidos quando necessário por reações que levam ao ciclo do ácido cítrico (em vez de para longe dele). Uma das reações mais importantes desse tipo é a conversão do piruvato ao oxaloacetato pela enzima piruvato-carboxilase:

$$\text{piruvato} + CO_2 + ATP + H_2O \rightarrow \text{oxaloacetato} + ADP + P_i + 2H^+$$

Esse é um dos vários exemplos de como as vias metabólicas são elegantemente equilibradas e trabalham unidas para manter as concentrações apropriadas de todos os metabólitos necessários pela célula (ver **Figura R13-6**).

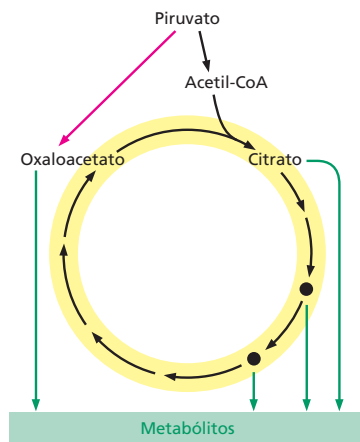



Figura R13-6

RESPOSTA 13-7 Os átomos de carbono nas moléculas de açúcar já são parcialmente oxidados, ao contrário de todos, com exceção apenas dos primeiros átomos de carbono nas cadeias acil dos ácidos graxos. Dessa forma, dois átomos de carbono da glicose são perdidos como CO_2 durante a conversão do piruvato em acetil-CoA, e apenas quatro dos seis átomos de carbono da molécula de açúcar são recuperados e podem entrar no ciclo do ácido cítrico, onde a maioria da energia é capturada. Em contrapartida, todos os átomos de carbono de um ácido graxo são convertidos em acetil-CoA.

RESPOSTA 13-8

A. Falso. Se fosse esse o caso, então a reação seria inútil para a célula. Nenhuma energia química seria capturada em uma forma útil (como, por exemplo, ATP) para ser utilizada em processos metabólicos. (Entretanto, as células seriam bem aquecidas!)

B. Falso. Nenhum processo de conversão de energia pode ser 100% eficiente. Lembre-se de que a entropia no universo sempre tende a aumentar, e para a maioria das reações isso acontece por meio da liberação de calor.

C. Verdadeiro. Os átomos de carbono na glicose estão em um estado reduzido comparado àqueles em CO_2, nos quais eles estão completamente oxidados.

D. Falso. A reação realmente produz certa quantidade de água, porém a água é tão abundante na biosfera que isso não é mais do que "uma gota no oceano".

E. Verdadeiro. Se ela ocorresse em apenas uma etapa, toda a energia seria liberada de uma só vez, e seria impossível aproveitá-la eficientemente para conduzir outras reações, como a síntese de ATP.

F. Falso. O oxigênio molecular (O_2) é utilizado apenas na última etapa da reação.

G. Verdadeiro. As plantas convertem CO_2 em açúcares pela captura da energia da luz na fotossíntese. O O_2 é produzido no processo e liberado pelas células vegetais.

H. Verdadeiro. As células crescendo anaerobiamente utilizam a glicólise para oxidar açúcares em piruvato. As células animais convertem piruvato em lactato, e o CO_2 não é produzido; as células de levedura, entretanto, convertem piruvato em etanol e CO_2. É esse o gás, liberado pelas leveduras durante a fermentação, que faz a massa do pão crescer e que gaseifica a cerveja e o champanhe.

RESPOSTA 13-9 Darwin exalou o átomo de carbono, o qual, portanto, deve ser o átomo de carbono da molécula de CO_2. Após passar algum tempo na atmosfera, a molécula de CO_2 deve ter entrado em uma célula vegetal, onde se tornou "fixada" pela fotossíntese e convertida em parte de uma molécula de açúcar. Enquanto é certo que essas primeiras etapas tenham ocorrido dessa forma, existem várias rotas diferentes que o átomo de carbono pode ter tomado a partir daí. O açúcar poderia ter sido quebrado pela célula vegetal em piruvato ou acetil-CoA, por exemplo, o qual teria entrado nas reações de biossíntese para construir um aminoácido. O aminoácido poderia ter sido incorporado em uma proteína da planta, talvez uma enzima, ou uma proteína que faz parte da parede celular. Você pode ter comido as folhas deliciosas da planta em sua salada e digerido a proteína em seu intestino para produzir aminoácidos novamente. Após circular em sua corrente sanguínea, o aminoácido deve ter sido absorvido por um glóbulo vermelho em desenvolvimento para produzir sua própria proteína, como a hemoglobina em questão. Se quisermos, é claro, podemos fazer nosso cenário de cadeia alimentar mais complicado. A planta, por exemplo, pode ter sido comida por um animal, o qual, por sua vez, foi consumido por você no almoço. Além disso, como Darwin morreu há mais de 100 anos, o átomo de carbono poderia ter viajado a mesma rota muitas vezes. Em cada rodada, entretanto, ele deveria começar novamente como gás CO_2, completamente oxidado, e entrar no mundo vivo após sua redução durante a fotossíntese.

RESPOSTA 13-10 As células de levedura crescem muito melhor aerobiamente. Sob condições anaeróbias elas não podem realizar a fosforilação oxidativa e, portanto, devem produzir todo o seu ATP pela glicólise, a qual é menos eficiente. Enquanto uma molécula de glicose produz um ganho real de duas moléculas de ATP por glicólise, a utilização adicional do ciclo do

ácido cítrico e da fosforilação oxidativa aumenta o rendimento de energia para cerca de 30 moléculas de ATP.

RESPOSTA 13-11 A quantidade de energia livre estocada na ligação fosfato na creatina fosfato é maior do que a da ligação anidrido no ATP. A hidrólise da creatina fosfato pode, portanto, ser diretamente acoplada à produção de ATP.

$$\text{creatina fosfato} + \text{ADP} \rightarrow \text{creatina} + \text{ATP}$$

A $\Delta G°$ para essa reação é –3 kcal/mol, indicando que ela segue rapidamente para a direita como escrito.

RESPOSTA 13-12 A extrema conservação da glicólise é a evidência de que todas as células atuais são derivadas de uma única célula inicial, como discutido no Capítulo 1. As elegantes reações da glicólise teriam, portanto, evoluído apenas uma vez e então teriam sido herdadas, ao passo que as células evoluíram. A invenção posterior da fosforilação oxidativa permitiu às reações subsequentes capturarem 15 vezes mais energia do que é possível pela glicólise sozinha. Essa eficiência marcante é próxima ao limite teórico e, como consequência, praticamente elimina a oportunidade para mais aperfeiçoamentos. Portanto, a geração de vias alternativas não resultaria em qualquer vantagem óbvia que pudesse ter sido selecionada pela evolução.

RESPOSTA 13-13 Como discutido no texto, 30 moléculas de ATP são produzidas a partir de cada molécula de glicose que é oxidada de acordo com a reação $C_6H_{12}O_6$ (glicose) + $6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ + energia. Dessa forma, uma molécula de O_2 é consumida para cada cinco moléculas de ATP produzidas. A célula, portanto, consome 2×10^8 moléculas de O_2/min, o que corresponde a um consumo de $3{,}3 \times 10^{-16}$ mols (= $[2 \times 10^8]/[6 \times 10^{23}]$) ou $7{,}4 \times 10^{-15}$ litros (= $3{,}3 \times 10^{-16} \times 22{,}4$) a cada minuto. O volume da célula é 10^{-15} m^3 [= $(10^{-15})^3$], o que é 10^{-12} litros. A célula, portanto, consome cerca de 0,7% (= $100 \times 7 \times 10^{-15}/10^{-12}$) do seu volume de gás O_2 a cada minuto, ou o seu próprio volume de gás O_2 em duas horas e 15 minutos.

RESPOSTA 13-14 Todas as reações possuem valores de ΔG negativos e são, portanto, energeticamente favoráveis (ver **Figura R13-14** dos diagramas energéticos).

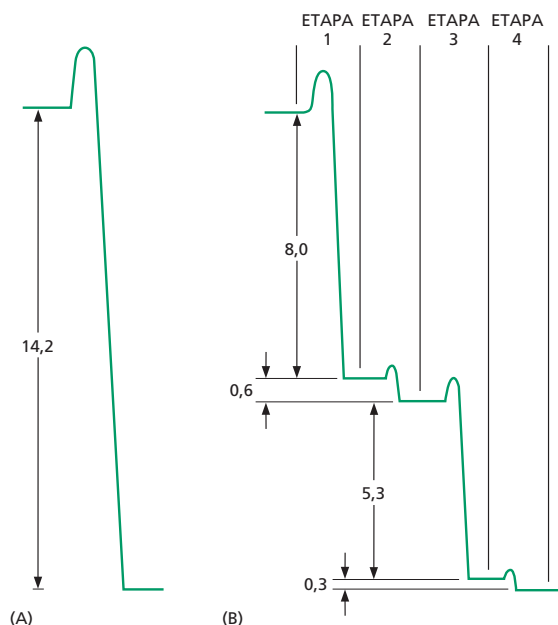
Figura R13-14

RESPOSTA 13-15

A. O piruvato é convertido em acetil-CoA, e o átomo marcado de ^{14}C é liberado como gás $^{14}CO_2$ (ver Figura 13-8B).
B. Seguindo o átomo marcado ^{14}C através de todas as reações do ciclo, mostradas no Painel 13-2 (p. 442-443), seria observado que o ^{14}C marcado adicionado seria quantitativamente recuperado no oxaloacetato. A análise também revela, entretanto, que ele não está mais no grupo cetona, mas no grupo metileno do oxaloacetato (**Figura R13-15**).

RESPOSTA 13-16 Na presença de oxigênio molecular, a fosforilação oxidativa converte a maioria da NADH celular em NAD^+. Uma vez que a fermentação requer NADH, ela é intensamente inibida pela disponibilidade de gás oxigênio.

CAPÍTULO 14

RESPOSTA 14-1 Tornando as membranas permeáveis a prótons, o DNP colapsa – ou diminui, em concentrações muito reduzidas – o gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna. As células continuam a oxidar moléculas de alimento para fornecer elétrons de alta energia para a cadeia transportadora de elétrons, mas o H^+ bombeado através da membrana flui de volta para o interior da mitocôndria em um ciclo inútil. Como resultado, a energia dos elétrons não pode ser capturada para a síntese de ATP, sendo liberada como calor. Pacientes que recebem pequenas doses de DNP perdem peso porque suas reservas de gorduras são utilizadas mais rapidamente para alimentar a cadeia transportadora de elétrons. O processo inteiro somente "desperdiça" energia.

Um mecanismo semelhante de produção de calor é utilizado por tecidos especializados formado por células de gordura marrom, as quais são abundantes em recém-nascidos humanos e em animais hibernantes. Essas células possuem numerosas mitocôndrias que vazam parte de seus gradientes de H^+ de volta, através da membrana, com o único propósito de manter aquecido o organismo. Essas células são marrons por possuírem grandes quantidades de mitocôndrias, as quais possuem altas concentrações de proteínas pigmentadas, como os citocromos.

RESPOSTA 14-2 A membrana mitocondrial interna é o local da fosforilação oxidativa e produz a maior parte do ATP da célula. As cristas são porções da membrana interna da mitocôndria que estão dobradas para dentro. As mitocôndrias que possuem alta densidade de cristas têm uma maior área de

COO^- – $^{14}C{=}O$ – CH_2 – COO^-

Oxaloacetato radioativo adicionado ao extrato

COO^- – $C{=}O$ – $^{14}CH_2$ – COO^-

Oxaloacetato radioativo isolado após uma volta do ciclo do ácido cítrico

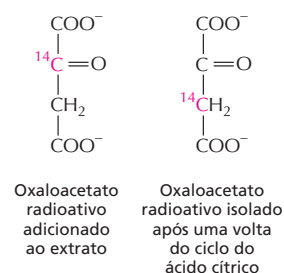



Figura R13-15

membrana interna e uma maior capacidade de realizar a fosforilação oxidativa.

O músculo cardíaco gasta grandes quantidades de energia durante as suas contínuas contrações; entretanto, as células da pele possuem uma demanda energética menor. Portanto, um aumento na densidade das cristas aumenta a capacidade de produzir ATP na célula do músculo cardíaco. Esse é um exemplo marcante de como as células ajustam a abundância de seus componentes de acordo com a necessidade.

RESPOSTA 14-3

A. O DNP colapsa completamente o gradiente eletroquímico de prótons. Os íons H^+ que são bombeados para um lado da membrana fluem livremente de volta, e, por consequência, nenhuma energia pode ser armazenada através da membrana.

B. Um gradiente eletroquímico é composto por dois componentes: um gradiente de concentração e um potencial eletroquímico. Se a membrana, com nigericina, torna-se permeável ao K^+, esse íon será conduzido para o interior da matriz pelo potencial eletroquímico da membrana interna (internamente negativa, externamente positiva). O influxo do K^+ positivamente carregado irá eliminar o potencial elétrico da membrana. Em contrapartida, o componente de concentração do gradiente de H^+ (a diferença de pH) não é afetada pela nigericina. Portanto, somente parte da força motriz que faz com que os íons H^+ fluam de volta para a matriz, de forma energeticamente favorável, é perdida.

RESPOSTA 14-4

A. Assim como uma turbina trabalhando em reverso é uma bomba de água gerando eletricidade, essa é análoga ao que a ATP-sintase se torna quando utiliza a energia da hidrólise do ATP para bombear prótons contra o gradiente eletroquímico, através da membrana mitocondrial interna.

B. A ATP-sintase deveria esquivar-se quando a energia que ela pode obter do gradiente de prótons é igual à ΔG necessária para produzir ATP; nesse ponto de equilíbrio, não existirá ganho líquido na síntese de ATP nem consumo líquido de ATP.

C. Quando as células utilizam todo o ATP, a razão ATP/ADP na matriz cai abaixo do ponto de equilíbrio, como descrito, e a ATP-sintase utiliza a energia armazenada no gradiente de prótons para sintetizar ATP, visando a restaurar a razão ATP/ADP original. De forma contrária, quando o gradiente eletroquímico de prótons cai abaixo do ponto de equilíbrio, a ATP-sintase utiliza ATP da matriz para restaurar esse gradiente.

RESPOSTA 14-5 Um par elétrico promove o bombeamento de 10 H^+, através da membrana, quando passa da NADH ao O_2 através dos três complexos respiratórios. São necessários 4 H^+ para produzir cada ATP: três para a síntese a partir do ADP e um para exportar o ATP para o citosol. Entretanto, 2,5 moléculas de ATP são sintetizadas de cada molécula de NADH.

RESPOSTA 14-6 Pode-se descrever quatro papéis essenciais das proteínas nesse processo. Primeiro, o ambiente químico fornecido por um aminoácido da cadeia lateral da proteína ajusta o potencial redox de cada íon de Fe de modo que os elétrons possam ser transferidos em uma ordem definida a partir de um componente para o próximo, desfazendo-se de sua energia em pequenas etapas e tornando-se mais firmemente ligados ao longo do processo. Segundo, as proteínas posicionam os íons Fe de forma que os elétrons possam mover-se eficientemente entre elas. Terceiro, as proteínas evitam que os elétrons saltem uma etapa intermediária; como já foi discutido para outras enzimas (discutido no Capítulo 4), canalizando o fluxo de elétrons ao longo de uma via definida. Quarto, as proteínas acoplam o movimento dos elétrons, a favor de sua redução energética, ao bombeamento de prótons através da membrana. Coletando, dessa forma, a energia que é liberada e armazenando-a em um gradiente de prótons que é então utilizado para produzir ATP.

RESPOSTA 14-7 Não seria produtivo utilizar o mesmo carreador em duas etapas. Se a ubiquinona, por exemplo, pudesse transferir elétrons diretamente para a citocromo-oxidase, o complexo citocromo *b*-c_1 iria ser frequentemente saltado quando os elétrons fossem coletados da NADH-desidrogenase. Dada a grande diferença no potencial redox entre a ubiquinona e a citocromo-oxidase, uma grande quantidade de energia seria liberada como calor e, assim, seria desperdiçada. A transferência de elétrons direto entre a NADH-desidrogenase e o citocromo *c* iria, similarmente, fazer com que o complexo citocromo *b*-c_1 fosse preterido.

RESPOSTA 14-8 Os prótons bombeados através da membrana mitocondrial interna para o interior do espaço intermembrana se equilibram com o citosol, o qual funciona como um grande dreno de H^+. Tanto a matriz mitocondrial quanto o citosol possuem muitas reações metabólicas que necessitam de um pH próximo à neutralidade. A diferença na concentração de H^+, ΔpH, que pode ser alcançada entre a matriz mitocondrial e o citosol é, entretanto, relativamente pequena (menor do que uma unidade de pH). Muito da energia armazenada no gradiente eletroquímico de prótons da mitocôndria se deve ao potencial eletroquímico da membrana (ver Figura 14-10).

Em contrapartida, os cloroplastos possuem um compartimento menor, no qual os íons H^+ são bombeados. Diferenças de concentração muito maiores podem ser atingidas (até milhares de vezes, ou 3 unidades de pH), e a maior parte da energia armazenada no gradiente de H^+ do tilacoide se deve à diferença na concentração de H^+ entre o espaço do tilacoide e o estroma.

RESPOSTA 14-9 A NADH e o NADPH diferem pela presença de um único grupo fosfato. O fosfato fornece ao NADPH uma leve diferença na forma em relação à NADH. Essa diferença permite que essa molécula seja reconhecida por enzimas diferentes e, assim, entregue seus elétrons para diferentes destinos. Essa divisão de tarefas é útil porque o NADPH tende a estar envolvida em reações biossintéticas, onde os elétrons de alta energia são utilizados para produzir moléculas biológicas de alta energia. A NADH, por outro lado, está envolvida em reações que oxidam moléculas de alimento ricas em energia para produzir ATP. No interior da célula, a razão NAD^+ e NADH é mantida elevada, considerando que a razão de $NADP^+$ e NADPH é mantida baixa. Isso fornece uma abundância de NAD^+ que age como um agente oxidante e uma abundância em NADPH que age como redutor – necessários para suas funções especiais no catabolismo e no anabolismo, respectivamente.

RESPOSTA 14-10

A. A fotossíntese produz açúcares, o mais importante é a sacarose, que são transportados das células fotossintéticas através da seiva, para as células da raiz. Nessas células, os açúcares são oxidados no citoplasma das células pela glicólise e nas mitocôndrias pela fosforilação oxidativa para produzir ATP, bem como sendo utilizados como blocos na construção de muitos outros metabólitos.

B. As mitocôndrias são necessárias, mesmo durante a luz do dia nas células que possuem cloroplastos, para suprir a célula com ATP produzido na fosforilação oxidativa. O gliceraldeído 3-fosfato produzido na fotossíntese dos cloroplastos se move para o citosol e, finalmente, é utilizado como fonte de energia para a mitocôndria produzir ATP.

RESPOSTA 14-11 Todas as alternativas estão corretas.

A. Essa é uma condição necessária. Se não fosse verdade, os elétrons não poderiam ser removidos da água, e a reação de quebra das moléculas de água ($H_2O \rightarrow 2H^+ + ½ O_2 + 2e^-$) não poderia ocorrer.
B. Essa transferência permite que a energia do fóton seja aproveitada como energia que pode ser utilizada em conversões químicas.
C. Pode-se afirmar que esse é um dos mais importantes obstáculos que deve ter sido superado durante a evolução da fotossíntese: moléculas de oxigênio parcialmente reduzidas, como as do radical superóxido O_2^-, são perigosamente reativas e irão atacar e destruir quase todas as moléculas biológicas. Entretanto, esses intermediários devem permanecer fortemente ligados a metais no sítio ativo da enzima até que todos os quatro elétrons tenham sido removidos de duas moléculas de água. É necessária uma captura sequencial de quatro fótons pelo mesmo centro de reação.

RESPOSTA 14-12

A. Verdadeiro. NAD^+ e as quinonas são exemplos de compostos que não possuem íons metálicos, mas podem participar na transferência de elétrons.
B. Falso. O potencial se deve aos prótons (H^+) que são bombeados através da membrana a partir da matriz para o espaço intermembrana. Os elétrons permanecem ligados a carreadores de elétrons na membrana mitocondrial interna.
C. Verdadeiro. Ambos os componentes contribuem para a força motriz que torna energeticamente favorável que o H^+ flua de volta para o interior da matriz.
D. Verdadeiro. Ambos se movem rapidamente no plano da membrana.
E. Falso. Não somente as plantas necessitam de mitocôndrias para produzir ATP nas células que não possuem cloroplastos, como nas células da raiz, como as mitocôndrias também produzem a maior parte do ATP citosólico em todas as células vegetais.
F. Verdadeiro. O funcionamento fisiológico da clorofila necessita que ela absorva luz; o heme ocorre somente como um composto colorido gerando a cor vermelha do sangue.
G. Falso. A clorofila absorve luz e transfere a energia na forma de um elétron energizado. Entretanto, o ferro do heme é um simples carreador de elétrons.
H. Falso. A maior parte do peso seco de uma árvore provém do carbono derivado do CO_2 que foi fixado durante a fotossíntese.

RESPOSTA 14-13 Ocorre a captura de três prótons. O valor preciso de ΔG para a síntese de ATP depende da concentração de ATP, ADP e P_i (como descrito no Capítulo 3). Quanto maior a razão de concentração entre ATP e ADP, maior energia é capturada para produzir ATP adicionais. Entretanto, valores menores do que 11 kcal/mol se aplicam a células que estão em condições de elevado gasto de energia e, consequentemente, com redução na razão normal de ATP/ADP.

RESPOSTA 14-14 Se nenhum O_2 está disponível, todos os componentes da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria se acumularão nas suas formas *reduzidas*. Isso ocorre porque os elétrons originados da NADH entram na cadeia, mas não conseguem ser transferidos para o O_2. A cadeia transportadora de elétrons fica paralisada, com todos os seus componentes na forma reduzida. Se o oxigênio é rapidamente restabelecido, os carreadores de elétrons na citocromo-oxidase se tornarão *oxidados* antes daqueles da NADH-desidrogenase. Isso ocorre porque, após a adição do oxigênio, a citocromo-oxidase doará seus elétrons diretamente para o O_2, tornando-se oxidado. Então, com o tempo, a onda de aumento de oxidação voltará para o início, a partir da citocromo-oxidase, através dos componentes da cadeia transportadora de elétrons, com cada componente recuperando a oportunidade de transferir os seus elétrons para os componentes à frente.

RESPOSTA 14-15 Quando oxidada, a ubiquinona se torna reduzida pegando dois elétrons e também dois prótons da água (Figura 14-19). Sob oxidação, esses prótons são liberados. Se ocorrer a redução em um dos lados da membrana e a oxidação no outro lado, um próton é bombeado através da membrana para cada elétron transportado. Assim, o transporte de elétrons pela ubiquinona contribui diretamente para gerar o gradiente de H^+.

RESPOSTA 14-16 As bactérias fotossintéticas e as células vegetais utilizam elétrons originados na reação $2H_2O \rightarrow 4e^- + 4H^+ + O_2$ para reduzir $NADP^+$ em NADPH, o qual então é utilizado para produzir metabólitos úteis. Se os elétrons fossem utilizados para H_2, em vez de O_2, as células perderiam todos os benefícios originados da reação, pois os elétrons não tomariam parte em reações metabolicamente úteis.

RESPOSTA 14-17

A. A troca de soluções cria um gradiente de pH através da membrana do tilacoide. O fluxo de íons H^+ em favor de seu potencial eletroquímico impulsiona a ATP-sintase, a qual converte ADP em ATP.
B. Nenhuma luz é necessária, pois o gradiente de H^+ é estabelecido artificialmente sem a necessidade de luz para promover a cadeia transportadora de elétrons.
C. Nenhum. O gradiente de H^+ seria na direção errada; a ATP-sintase não funcionaria.
D. O experimento forneceu evidências que suportam o modelo quimiosmótico, mostrando que um gradiente de H^+ sozinho é suficiente para promover a síntese de ATP.

RESPOSTA 14-18

A. Quando as vesículas são expostas à luz, os íons H^+ (originados da H_2O) que foram bombeados para o interior das vesículas pela bacteriorrodopsina fluem de volta para fora através da ATP-sintase, promovendo a formação de ATP na solução que circunda a vesícula, em resposta à luz.
B. Se as vesículas tiverem vazamentos, nenhum gradiente de H^+ poderá ser formado; assim, a ATP-sintase não funcionará.
C. O uso de componentes, a partir de organismos amplamente divergentes, pode ser uma ferramenta experimental poderosa. Como as duas proteínas são provenientes de origens diferentes, é improvável que elas formem uma interação funcional direta. Entretanto, o experimento sugere fortemente que o transporte de elétrons e a síntese de ATP sejam eventos separados. Portanto, essa abordagem é válida.

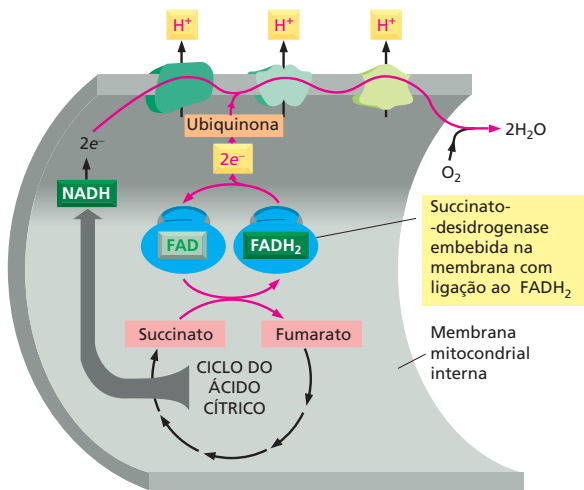



Figura R14-19

RESPOSTA 14-19 O potencial redox do $FADH_2$ é muito baixo para transferir elétrons para o complexo NADH-desidrogenase, mas elevado o suficiente para transferir elétrons para a ubiquinona (Figura 14-20). Portanto, os elétrons do $FADH_2$ podem entrar somente nessa etapa da cadeia transportadora de elétrons (**Figura R14-19**). Como o complexo NADH-desidrogenase é preterido, menos íons H^+ são bombeados através da membrana e menos ATP é produzido. Esse exemplo mostra a versatilidade da cadeia transportadora de elétrons. Acredita-se que a capacidade de utilizar diferentes fontes de elétrons, a partir do meio ambiente, para sustentar o transporte eletrônico, tenha sido uma característica essencial no início da evolução da vida.

RESPOSTA 14-20 Se essas bactérias utilizam um gradiente de prótons para produzir o seu ATP, de uma maneira análoga às outras bactérias (isto é, menos prótons dentro do que fora), elas iriam necessitar aumentar o pH citoplasmático em níveis mais elevados do que o seu ambiente (pH 10). Células com pH citoplasmático maior do que 10 não seriam viáveis. Consequentemente, essas bactérias devem utilizar um gradiente de íons diferentes de H^+, como um gradiente de Na^+, em um acoplamento quimiosmótico entre o transporte de elétrons e a ATP-sintase.

RESPOSTA 14-21 Alternativas A e B estão corretas.

A alternativa C está errada porque as reações químicas que ocorrem em cada ciclo são completamente diferentes, ainda que o efeito líquido seja o mesmo, como esperado para uma simples reversão.

RESPOSTA 14-22 Esse experimento sugere um modelo de duas etapas para o funcionamento da ATP-sintase. De acordo com esse modelo, o fluxo de prótons através da base da ATP-sintase promove a rotação da cabeça, a qual ocasiona a síntese de ATP. Em seus experimentos, os autores tiveram sucesso em desacoplar essas duas etapas. Se a rotação mecânica da cabeça é suficiente para produzir ATP na ausência de qualquer gradiente de prótons, a ATP-sintase é um mecanismo proteico que funciona, de fato, como uma "turbina molecular". Esse experimento é muito excitante, pois ele demonstraria diretamente a relação entre o movimento mecânico e a atividade enzimática. Não existe dúvida de que ele seria publicado e que se tornaria um "clássico".

RESPOSTA 14-23 Somente sob essas condições (E), é observada a transferência de elétrons, com o citocromo *c* tornando-se reduzido. Uma parte da cadeia transportadora de elétrons foi reconstituída nessa composição. Os elétrons podem fluir na direção energeticamente favorável a partir da ubiquinona reduzida para o complexo citocromo *b*-c_1 e para o citocromo *c*. Embora energeticamente favorável, a transferência em (A) não pode ocorrer de forma espontânea na ausência do complexo citocromo *b*-c_1 que catalisa essa reação. Não ocorre fluxo de elétrons nos outros experimentos, quer o complexo citocromo *b*-c_1 esteja presente ou não: no experimento (B) e (F), tanto a ubiquinona quanto o citocromo *c* estão oxidados; nos experimentos (C) e (G), ambos estão reduzidos. Nos experimentos (D) e (H), o fluxo de elétrons é energeticamente desfavorável porque o citocromo *c* reduzido possui uma menor energia livre do que a ubiquinona oxidada.

CAPÍTULO 15

RESPOSTA 15-1 Ainda que o envelope nuclear forme uma membrana contínua, ele possui regiões especializadas, as quais contêm proteínas especiais e têm uma aparência característica. Uma dessas regiões especializadas é a membrana nuclear interna. Proteínas de membrana podem, de fato, difundir entre as membranas nucleares interna e externa, nas conexões formadas ao redor dos poros nucleares. Aquelas proteínas com funções particulares na membrana interna, no entanto, estão geralmente ancoradas aí por sua interação com outros componentes como os cromossomos e a lâmina nuclear (uma malha proteica subjacente à membrana nuclear interna que ajuda a dar integridade estrutural ao envelope nuclear).

RESPOSTA 15-2 A expressão genética eucariótica é mais complicada do que a expressão genética procariótica. Em particular, células procarióticas não possuem íntrons que interrompem as sequências codificantes de seus genes, de forma que um mRNA pode ser traduzido imediatamente após ser transcrito, sem a necessidade de processamento posterior (discutido no Capítulo 7). De fato, nas células procarióticas, os ribossomos iniciam a tradução da maioria dos mRNAs antes do final da transcrição. Isso teria consequências desastrosas em células eucarióticas, uma vez que a maioria dos transcritos de RNA deve passar por *splicing* antes de serem traduzidos. O envelope nuclear separa os processos de transcrição e de tradução em espaço e tempo: um transcrito de RNA primário é mantido no núcleo até que seja propriamente processado para formar um mRNA, e somente então esse pode deixar o núcleo para ser traduzido pelo ribossomo.

RESPOSTA 15-3 Uma molécula de mRNA é anexada à membrana do RE pelos ribossomos que as estão traduzindo. Essa população de ribossomos, entretanto, não é estática; o mRNA é continuamente movido pelo ribossomo. Aqueles ribossomos que tenham terminado a tradução se dissociam da extremidade 3′ do mRNA e da membrana do RE, mas o mRNA permanece ligado por outros ribossomos, recém-recrutados do reservatório citosólico, que se anexaram à extremidade 5′ do mRNA e ainda o estão traduzindo. Dependendo da sua extensão, há cerca de

10-20 ribossomos anexados a cada molécula de mRNA ligada à membrana.

RESPOSTA 15-4

A. A sequência-sinal interna funciona como uma âncora de membrana, como mostrado na Figura 15-16. Uma vez que não há uma sequência de parada de transferência, no entanto, a terminação carboxílica da proteína continua a ser translocada para dentro do lúmen do RE. A proteína resultante, dessa forma, tem seu domínio N-terminal no citosol, seguido de um único segmento transmembrânico, e um domínio C-terminal no lúmen do RE (**Figura R15-4A**).
B. A sequência-sinal N-terminal inicia a translocação do domínio N-terminal da proteína até a translocação ser encerrada por uma sequência de parada de transferência. Um domínio citosólico é sintetizado até que a sequência de início de transferência inicie a translocação novamente. A situação agora se assemelha àquela descrita em (A), e o domínio C-terminal da proteína é translocado ao lúmen do RE. A proteína resultante, dessa forma, transpassa a membrana duas vezes. Tanto o seu domínio N-terminal quanto o seu domínio C-terminal estão no lúmen do RE, e um domínio em forma de laço entre as duas regiões transmembrânicas está exposto no citosol (Figura R15-4B).
C. Seria necessária uma sequência-sinal clivada, seguida por uma sequência interna de finalização de transferência, acompanhada de pares de sequências de início e fim de transferência (Figura R15-4C).

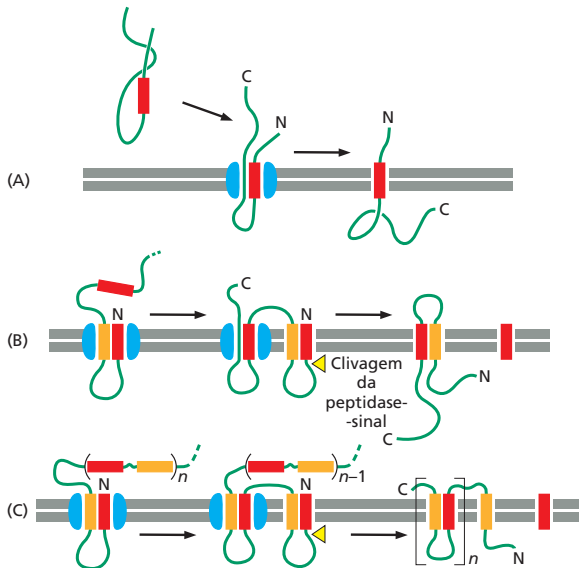



Figura R15-4

Esses exemplos demonstram que topologias proteicas complexas podem ser alcançadas por simples variações e combinações de dois mecanismos básicos mostrados nas Figuras 15-15 e 15-16.

RESPOSTA 15-5

A. As capas de clatrina não podem ser montadas na ausência de adaptinas que liguem a clatrina à membrana. Sob altas concentrações de clatrina e sob condições iônicas apropriadas, as gaiolas de clatrina são armadas em solução, mas são cápsulas vazias, sem outras proteínas e sem membrana. Isso mostra que a informação para formar cestas de clatrina está contida nas suas próprias moléculas, as quais são, portanto, capazes de realizar sua própria montagem.
B. Sem clatrina, as adaptinas ainda se ligam a receptores da membrana, mas a capa de clatrina não é formada, e, portanto, fossas e vesículas revestidas de clatrina não são produzidas.
C. Fossas revestidas de clatrina profundamente invaginadas são formadas na membrana, mas elas não se destacam para compor vesículas.
D. Células procarióticas não realizam a endocitose. Uma célula procariótica, portanto, não contém receptores com caudas citosólicas apropriadas que possam mediar a ligação da adaptina. Dessa forma, a clatrina não pode ligar-se, e suas capas não podem ser montadas.

RESPOSTA 15-6 As cadeias de açúcares pré-montadas permitem melhor controle de qualidade. As cadeias oligossacarídicas montadas podem ter sua precisão verificada antes de serem adicionadas à proteína; se ocorresse um erro na adição individual de açúcares à proteína, toda a proteína teria de ser descartada. Uma vez que muito mais energia é necessária para construir uma proteína do que para construir uma cadeia oligossacarídica curta, essa é uma estratégia muito mais econômica. Além disso, uma vez que uma estrutura arbórea de açúcares é adicionada à proteína, é mais difícil que enzimas modifiquem seus ramos, comparada a sua modificação nas estruturas arbóreas de açúcares livres. Essa dificuldade se torna aparente à medida que a proteína se move para a superfície celular: ainda que as cadeias de açúcares sejam continuamente modificadas por enzimas em vários compartimentos da via secretória, essas modificações são frequentemente incompletas e resultam em considerável heterogeneidade das glicoproteínas que deixam a célula. Essa heterogeneidade é largamente devida ao acesso restrito que as enzimas têm às estruturas arbóreas de açúcares anexadas à superfície das proteínas. A heterogeneidade também explica por que as glicoproteínas são mais difíceis de estudar do que proteínas purificadas ou não glicosiladas.

RESPOSTA 15-7 Agregados de proteínas secretórias se formariam no RE, assim como eles se formam na rede *trans* de Golgi. Como a agregação é específica de proteínas secretórias, as proteínas de RE seriam excluídas dos agregados, que, finalmente, seriam degradados.

RESPOSTA 15-8 A transferrina sem Fe ligado não interage com seu receptor e circula na corrente sanguínea até captar um íon Fe. Uma vez que o ferro está ligado, o complexo transferrina-ferro pode ligar-se ao receptor de transferrina na superfície de uma célula e sofrer endocitose. Sob as condições ácidas do endossomo, a transferrina libera seu ferro, mas permanece ligada ao seu receptor, o qual é reciclado de volta à superfície celular, onde encontra o ambiente de pH neutro do sangue. O pH neutro causa a liberação da transferrina pelo receptor na circulação, onde ela pode captar outro íon Fe para repetir o ciclo. O ferro liberado no endossomo, como o LDL na Figura 15-33, move para o lisossomo, de onde é transportado para o citosol.

O sistema permite a captação de ferro de forma eficiente ainda que a concentração desse no sangue seja extremamente baixa. O ferro ligado à transferrina é concentrado na superfície celular pela ligação a receptores de transferrina; ele se torna

ainda mais concentrado nas fossas revestidas de clatrina, as quais coletam os receptores de transferrina. Dessa maneira, a transferrina circula entre o sangue e os endossomos, entregando o ferro que as células necessitam para crescer.

RESPOSTA 15-9

A. Verdadeiro.
B. Falso. As sequências-sinal que direcionam as proteínas ao RE contêm um cerne de oito ou mais aminoácidos hidrofóbicos. A sequência mostrada aqui contém muitos aminoácidos com cadeias laterais hidrofílicas, incluindo os aminoácidos carregados His, Arg, Asp e Lys, e os aminoácidos hidrofílicos não carregados Gln e Ser.
C. Verdadeiro. Caso contrário, eles não poderiam ancorar na membrana-alvo correta ou recrutar um complexo de fusão a um sítio de ancoramento.
D. Verdadeiro.
E. Verdadeiro. As proteínas lisossômicas são selecionadas na rede *trans* de Golgi e empacotadas em vesículas de transporte que as entregam aos endossomos tardios. Se não fossem selecionadas, elas entrariam por descuido em vesículas de transporte que se movem constitutivamente para a superfície celular.
F. Falso. Os lisossomos também digerem organelas internas por autofagia.
G. Falso. As mitocôndrias não participam do transporte vesicular, e, portanto, glicoproteínas *N*-ligadas, que são exclusivamente montadas no RE, não podem ser transportadas para as mitocôndrias.

RESPOSTA 15-10 Elas devem conter também um sinal de localização nuclear. As proteínas com sinal de exportação nuclear se movem entre o núcleo e o citosol. Um exemplo é a proteína A1, a qual se liga aos mRNAs no núcleo e os guia pelos poros nucleares. Uma vez no citosol, um sinal de localização nuclear assegura que a proteína A1 seja reimportada, de forma que possa participar da exportação de outros aos mRNAs.

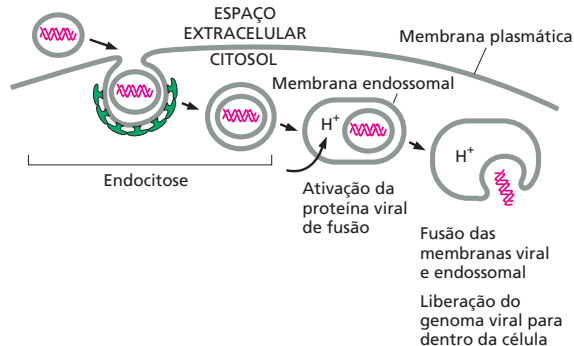
RESPOSTA 15-11 O vírus influenza entra na célula por endocitose e é entregue aos endossomos, onde encontra um pH ácido que ativa sua proteína de fusão. A membrana viral então se fusiona com a membrana do endossomo, liberando o genoma viral no citosol (**Figura R15-11**). O NH_3 é uma molécula pequena que prontamente penetra na membrana. Dessa forma, ele pode entrar em todos os compartimentos intracelulares, incluindo os endossomos, por difusão. Uma vez em um compartimento que tem um pH ácido, o NH_3 se liga a H^+ para formar NH_4^+, o qual é um íon carregado e, portanto, não pode atravessar a membrana por difusão. Íons NH_4^+, portanto, se acumulam nos compartimentos ácidos aumentando seu pH. Quando o pH do endossomo é aumentado, os vírus são ainda endocitados, mas uma vez que a proteína de fusão viral não pode ser ativada, os vírus não podem entrar no citosol. Lembre disso na próxima vez que estiver gripado e tenha acesso a um estábulo.

ESPAÇO EXTRACELULAR
CITOSOL
Membrana plasmática
Membrana endossomal
Endocitose
H^+
Ativação da proteína viral de fusão
Fusão das membranas viral e endossomal
Liberação do genoma viral para dentro da célula

Figura R15-11

RESPOSTA 15-12

A. O problema é que vesículas contendo dois diferentes tipos de v-SNAREs em sua membrana poderiam ancorar-se em qualquer de duas diferentes membranas.
B. A resposta a esse enigma ainda não é conhecida, mas pode-se prever que as células tenham meios de ligar e desligar a habilidade de ancoramento das SNAREs. Isso pode ser realizado por outras proteínas que sejam, por exemplo, coempacotadas com as SNAREs no RE em vesículas de transporte e facilitem a interação da v-SNARE correta com a t-SNARE na rede *cis* de Golgi.

RESPOSTA 15-13 A transmissão sináptica envolve a liberação de neurotransmissores por exocitose. Durante esse evento, a membrana da vesícula sináptica se fusiona com a membrana plasmática dos terminais nervosos. Para fazer novas vesículas sinápticas, a membrana deve ser recuperada da membrana plasmática por endocitose. Esse processo de endocitose é bloqueado se a dinamina for defeituosa, uma vez que essa proteína parece ser necessária para destacar as vesículas endocíticas revestidas de clatrina. O primeiro indício para decifrar o papel da dinamina veio de microfotografias eletrônicas de sinapses de moscas mutantes (**Figura R15-13**). Note que há muitas invaginações em forma de cantil da membrana plasmática, representando fossas revestidas de clatrina profundamente invaginadas que não podem se destacar. Os colares visíveis ao redor dos pescoços dessas invaginações são constituídos de dinaminas mutantes.

A partir de J.H. Koenig e K. Ikeda, *J. Neurosci*. 9:3844-3860, 1989. Com permissão de The Society for Neuroscience.

Figura R15-13

RESPOSTA 15-14 As duas primeiras sentenças são corretas. A terceira, não. Deveria ser: "Uma vez que o conteúdo do lúmen do RE ou de outro compartimento qualquer das vias secretórias ou endocíticas nunca se misturam com o citosol, as proteínas que entram nessas vias nunca precisarão ser importadas novamente". Quando o envelope nuclear colapsa durante a mitose, ou seja, sai da cromatina, suas proteínas de membrana se misturam com as proteínas de membrana do RE, mas seu conteúdo permanece separado do citosol por uma membrana intacta.

RESPOSTA 15-15 A proteína é translocada para dentro do RE. Sua sequência-sinal de RE é reconhecida assim que emerge do ribossomo. O ribossomo, então, se torna ligado à membrana do RE, e o polipeptídeo crescente é transferido por um canal de translocação. A sequência de localização nuclear, portanto, nunca é exposta ao citosol. Ela nunca encontrará receptores de importação nuclear, e a proteína nunca entrará no núcleo.

RESPOSTA 15-16 (1) As proteínas são importadas para dentro do núcleo após serem sintetizadas, dobradas e, se apropriado, montadas em complexos. Em contrapartida, cadeias polipeptídicas desdobradas são translocadas para dentro do RE à medida que são sintetizadas pelos ribossomos. Esses são montados no núcleo ainda que exerçam sua função no citosol, e complexos enzimáticos que catalisam transcrição e *splicing* de RNA são montados no citosol ainda que exerçam sua função no núcleo. Dessa forma, tanto os ribossomos como esses complexos enzimáticos precisam ser transportados por poros nucleares intactos. (2) Os poros nucleares são portões, os quais estão sempre abertos a pequenas moléculas; em contraste, os canais de translocação da membrana do RE estão normalmente fechados (como indicado pelo plugue na Figura 15-15) e se abrem apenas após o ribossomo se anexar à membrana e a cadeia polipeptídica em translocação selar o canal para o citosol. É importante que a membrana do RE permaneça impermeável a pequenas moléculas durante o processo de translocação, uma vez que o RE é o principal depósito de Ca^{2+} da célula, e a liberação de Ca^{2+} no citosol deve ser bastante controlada (discutido no Capítulo 16). (3) Sinais de localização nuclear não são clivados após a importação das proteínas para o núcleo; em contrapartida, peptídeos-sinal do RE são normalmente clivados. Sinais de localização nuclear são necessários para a reimportação repetida de proteínas nucleares após essas terem sido liberadas no citosol durante a mitose, quando o envelope nuclear colapsa.

RESPOSTA 15-17 A mistura transiente do conteúdo nuclear e citosólico durante a mitose sustenta a ideia de que o interior nuclear e o citosol são de fato relacionados evolutivamente. De fato, pode-se considerar o núcleo como um subcompartimento do citosol que se tornou circundado por um envelope nuclear, com acesso apenas pelos poros nucleares.

RESPOSTA 15-18 A explicação vigente é que uma única mudança de aminoácido na proteína causa uma pequena malformação, de forma que, apesar de ainda ser ativa como inibidor de protease, ela é impedida por proteínas chaperonas do RE de deixar essa organela. Ela, portanto, se acumula no lúmen do RE e é finalmente degradada. Interpretações alternativas poderiam ter sido que (1) a mutação afeta a estabilidade da proteína na corrente sanguínea, de forma que ela é degradada mais rapidamente no sangue do que a proteína normal, ou (2) a mutação inativa a sequência-sinal de RE e evita a entrada da proteína no RE. (3) Outra explicação poderia ser a de que a mutação altera a sequência para criar um sinal de retenção no RE, a qual teria retido a proteína mutante no RE. Pode-se distinguir entre essas possibilidades usando anticorpos contra a proteína, marcados por fluorescência, ou expressar a proteína como uma fusão com GFP para monitorar seu transporte nas células (ver Painel 4-6, p. 167, e Como Sabemos, p. 520-521).

RESPOSTA 15-19 Comente: "A Dra. Outonalimb propõe o estudo da biossíntese de 'esquecendo', uma proteína de significativo interesse. A hipótese principal na qual a proposta se baseia, no entanto, requer sustentação adicional. Em particular, é questionável se 'esquecendo' é de fato uma proteína secretada, como proposto. As sequências-sinal de RE são normalmente encontradas na porção N-terminal. Sequências hidrofóbicas C-terminais seriam expostas fora do ribossomo somente após a síntese proteica já haver terminado e não poderiam, portanto, ser reconhecidas por um SRP durante a tradução. É, portanto, improvável que 'esquecendo' seja translocada por um mecanismo dependente de SRP, e possa, dessa forma, permanecer no citosol. Dr. Outolimb deve levar essas considerações em conta quando submeter uma solicitação revisada".

RESPOSTA 15-20 O aparelho de Golgi pode ter evoluído de porções especializadas da membrana do RE. Essas regiões do RE poderiam ter-se destacado, formando um compartimento novo (**Figura R15-20**), o qual ainda se comunica com o RE por transporte vesicular. Para que o recém-evoluído compartimento de Golgi fosse útil, as vesículas de transporte também deveriam ter evoluído.

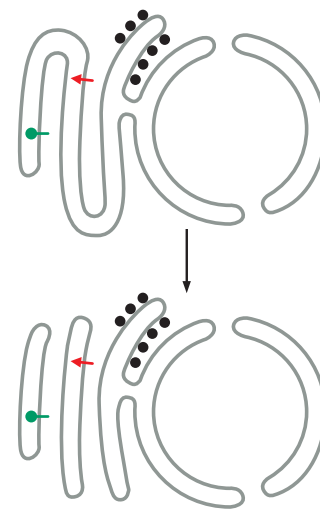



Figura R15-20

RESPOSTA 15-21 Essa é uma questão do tipo "ovo e galinha". De fato, a situação nunca surge nas células de hoje, ainda que tenha representado um problema considerável para as primeiras células que evoluíram. Novas membranas celulares são fabricadas pela expansão de membranas existentes, e o RE nunca é fabricado *de novo*. Sempre haverá um fragmento de RE com canais de translocação para integrar novos canais de translocação. A herança, portanto, não está limitada à propagação do genoma; as organelas de uma célula também devem ser passadas de geração à geração. De fato, os canais de translocação do RE podem ser rastreados até canais de translocação estruturalmente relacionados na membrana plasmática procariótica.

RESPOSTA 15-22

A. Espaço extracelular
B. Citosol
C. Membrana plasmática
D. Capa de clatrina
E. Membrana de fossa de clatrina profundamente invaginada
F. Partículas carga capturadas
G. Lúmen de fossa de clatrina profundamente invaginada

CAPÍTULO 16

RESPOSTA 16-1 A maioria das moléculas de sinalização parácrina possui uma vida muito curta após serem liberadas das células sinalizadoras: elas são degradadas por enzimas extracelulares ou são captadas rapidamente pelas células-alvo vizinhas. Além disso, algumas aderem à matriz extracelular e, dessa forma, são impedidas de difundir-se para muito longe.

RESPOSTA 16-2 Os grupos polares são hidrofílicos, e o colesterol seria hidrofóbico demais para ser um hormônio efetivo porque tem somente um grupo –OH. Visto que é praticamente insolúvel em água, ele não poderia se mover facilmente pelo líquido extracelular como um mensageiro de uma célula para outra.

RESPOSTA 16-3 A proteína poderia ser uma enzima que produz um grande número de pequenas moléculas sinalizadoras intracelulares como o AMP cíclico ou o GMP cíclico. Ou ela poderia ser uma enzima que modifica um grande número de proteínas-alvo intracelulares, por exemplo, por fosforilação.

RESPOSTA 16-4 No caso do receptor para hormônios esteroides, um complexo um para um de hormônio e receptor se liga ao DNA para inibir ou ativar a expressão gênica. Portanto, não existe amplificação entre a interação com o ligante e a regulação da transcrição. A amplificação ocorre mais tarde, porque a transcrição de um gene dá origem a muitos RNA mensageiros que são traduzidos gerando muitas moléculas de proteína (discutido no Capítulo 7). No caso dos receptores associados a canais iônicos, um único canal permite a passagem de milhares de íons durante o tempo em que estiver aberto. Isso funciona como a etapa de amplificação nesse tipo de sistema de sinalização.

RESPOSTA 16-5 A proteína G mutante seria ativada de forma contínua, visto que o GDP se dissociaria espontaneamente, permitindo a ligação do GTP mesmo na ausência de um receptor ativado. As consequências para a célula seriam, por isso, semelhantes às causadas pela toxina do cólera, a qual modifica a subunidade α de G_s de forma que ela não pode mais hidrolisar GTP e se inativar. Ao contrário do caso da toxina do cólera, contudo, a proteína G mutante não ficaria ativada permanentemente: ela seria inativada normalmente, mas se tornaria ativa de novo, de forma instantânea, no momento que o GDP se dissociasse e um GTP se ligasse a ela.

RESPOSTA 16-6 A degradação rápida mantém baixa a concentração intracelular de AMP cíclico. Quanto mais baixos forem os níveis de AMP cíclico, maior e mais rápido será o aumento alcançado após a ativação da adenilato-ciclase, a qual sintetiza novas moléculas do mensageiro. Se você tiver R$ 100,00 no banco e depositar mais R$ 100,00, você terá dobrado o seu saldo. Se você tiver somente R$ 10,00 no início e depositar R$ 100,00, você terá aumentado 10 vezes seu saldo, um aumento proporcionalmente muito maior com o mesmo valor de depósito.

RESPOSTA 16-7 Lembre-se de que a membrana plasmática constitui uma área relativamente pequena quando comparada com o total de superfícies membranares em uma célula (discutido no Capítulo 15). O retículo endoplasmático é especialmente abundante e atravessa todo o volume celular como uma vasta rede de tubos e lâminas. O Ca^{2+} armazenado no retículo endoplasmático pode ser, por isso, distribuído por todo o citosol. Isso é importante porque a remoção rápida do íon do citosol pelas bombas impede a difusão do Ca^{2+} a distâncias significativas.

RESPOSTA 16-8 Cada uma das reações envolvidas em um esquema de amplificação deve ser "desligada" para que a via de sinalização restaure seu nível de repouso. Todos esses "desligamentos" são igualmente importantes.

RESPOSTA 16-9 A ligação dos anticorpos aos receptores pode induzir a agregação desses últimos na superfície da célula, porque os anticorpos possuem dois sítios de ligação ao antígeno. Isso é o mesmo que ativar os receptores tirosina cinase, os quais são ativados por dimerização. No caso dos receptores tirosina-cinase, a dimerização permite que os domínios de cinase dos receptores individuais fosforilem receptores adjacentes. A ativação dos receptores associados à proteína G é mais complicada, porque o ligante tem de induzir uma determinada mudança de conformação. Somente anticorpos muito especiais mimetizam suficientemente bem um ligante para induzir a mudança conformacional que ativa o receptor.

RESPOSTA 16-10 Quanto mais etapas uma via de sinalização intracelular tiver, mais locais a célula tem para regular a via, por amplificação do sinal, pela integração dos sinais vindos de vias diferentes e pela sua disseminação ao longo de vias divergentes (ver Figura 16-13).

RESPOSTA 16-11

A. Verdadeiro. A acetilcolina, por exemplo, reduz o batimento das células cardíacas porque se liga a um receptor associado à proteína G e estimula a contração das células musculares esqueléticas por se ligar a um receptor diferente, que é um canal iônico controlado por ligante.
B. Falso. A acetilcolina tem vida curta e exerce seus efeitos localmente. O prolongamento de sua vida pode ser desastroso. Os compostos que inibem a enzima acetilcolinesterase, a qual normalmente degrada a acetilcolina em uma sinapse neuromuscular, são extremamente tóxicos. Por exemplo, o gás nervoso sarin, usado em guerra química, é um inibidor da acetilcolinesterase.
C. Verdadeiro. Os complexos $\beta\gamma$ sem nucleotídeo ligado podem ativar canais iônicos, e subunidades α com GTP ligado podem ativar enzimas. A proteína G trimérica com GDP ligado é a forma inativa.
D. Verdadeiro. O fosfolipídeo de inositol que é hidrolisado para produzir IP_3 possui três grupos fosfato, e um deles liga o açúcar ao diacilglicerol. O IP_3 é gerado por uma única reação de hidrólise (ver Figura 16-25).
E. Falso. A calmodulina sente, mas não regula, os níveis intracelulares de Ca^{2+}.
F. Verdadeiro. Ver Figura 16-39.
G. Verdadeiro. Ver Figura 16-30.

RESPOSTA 16-12

1. Você esperaria um alto nível basal de atividade de Ras porque ela não pode ser inativada eficientemente.
2. Como algumas moléculas de Ras já têm GTP ligado, sua atividade em resposta a um sinal extracelular seria maior do que o normal, mas estaria sujeita à saturação quando todas as moléculas fossem convertidas na forma ligada a GDP.
3. A resposta a um sinal seria muito menos rápida, porque o aumento de Ras ligada a GTP dependente de sinal ocorreria em um nível basal elevado de Ras preexistente (ver Questão 16-6).
4. O aumento na atividade de Ras em resposta a um sinal seria também prolongado em comparação com as células normais.

RESPOSTA 16-13

A. Ambos os sinais podem ocorrer a longa distância: os neurônios podem enviar potenciais de ação ao longo de axônios

muito longos (pense nos axônios no pescoço da girafa, por exemplo), e os hormônios são transportados pela corrente sanguínea para todo o organismo. A concentração das moléculas-sinal é alta porque os neurônios secretam grande quantidade de neurotransmissores para a sinapse, um espaço pequeno e bem definido entre duas células. Por isso, os receptores só precisam se ligar aos neurotransmissores com baixa afinidade. Ao contrário, os hormônios estão muito diluídos na corrente sanguínea, onde circulam frequentemente em concentração muito baixa. Seus receptores, por isso, se ligam a eles com uma afinidade extremamente alta.

B. Enquanto a sinalização neuronal é um assunto privado, onde um neurônio se comunica com um grupo selecionado de células-alvo por meio de conexões sinápticas específicas, a sinalização hormonal é um anúncio público, onde as células-alvo percebem os níveis de hormônio no sangue. A sinalização neuronal é muito rápida, limitada apenas pela velocidade de propagação do potencial de ação e atividade das sinapses, e a sinalização hormonal é mais lenta, limitada pelo fluxo sanguíneo e pela difusão por maiores distâncias.

RESPOSTA 16-14

A. Existem 100.000 moléculas de X e 10.000 moléculas de Y na célula (= taxa de síntese × vida média).

B. Depois de um segundo, a concentração de X terá aumentado em 10.000 moléculas. Por isso, um segundo após sua síntese aumentar, a concentração de X será de 110.000 moléculas por célula – o que representa um aumento de 10% em relação ao valor antes do aumento da síntese. A concentração de Y também aumenta em 10.000 moléculas, o que representa um aumento total de duas vezes (para simplificar, podemos omitir a degradação nessa estimativa porque X e Y são relativamente estáveis durante o período de um segundo).

C. Em virtude do aumento proporcionalmente maior de Y, essa é a molécula sinalizadora preferencial. Esse cálculo ilustra um princípio inesperado, mas importante: o tempo necessário para que um sinal seja "ligado" é determinado pelo tempo de vida da molécula sinalizadora.

RESPOSTA 16-15 A informação transmitida por uma via de sinalização celular está contida na *concentração* do mensageiro, quer ele seja uma molécula pequena ou uma proteína fosforilada. Portanto, para que se possa detectar uma mudança na concentração, o mensageiro original deve ser rapidamente destruído. Quanto mais curto for o tempo de vida do mensageiro, mais rapidamente o sistema pode responder às mudanças. A comunicação humana se baseia em mensagens que são distribuídas somente uma vez e que geralmente não são interpretadas por sua abundância, mas por seu *conteúdo*. Assim, é um erro matar os mensageiros, pois eles podem ser usados mais de uma vez.

RESPOSTA 16-16

A. O receptor tirosina-cinase mutante sem seu domínio extracelular de interação com o ligante é inativo. Ele não pode ligar os sinais extracelulares, e sua presença não interfere no funcionamento do receptor normal (**Figura R16-16A**).

B. O receptor mutante sem o domínio intracelular também é inativo, mas sua presença bloqueia a sinalização pelo receptor normal. A ligação de uma molécula sinalizadora aos receptores induz sua dimerização. Deve acontecer dimerização entre dois receptores normais para que possam ser fosforilados mutuamente e ativados. Contudo, na presença de um excesso de receptor mutante, os receptores normais formarão dímeros mistos, cujos domínios intracelulares não podem ser ativados porque seu parceiro é mutante e não possui o domínio de cinase (Figura R16-16B).

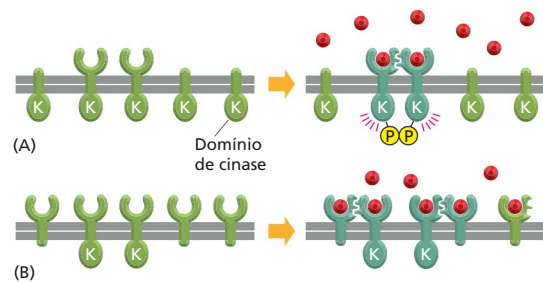



Figura R16-16

RESPOSTA 16-17 A afirmativa é correta. Ao interagir com o ligante, as hélices transmembrana dos receptores multipasso, como os receptores associados à proteína G, são submetidas a um rearranjo uma em relação à outra (**Figura R16-17A**). Essa mudança conformacional é percebida no lado citosólico da membrana em virtude de uma alteração no arranjo da alças citoplasmáticas. Um segmento transmembrana único não é suficiente para transmitir o sinal pela membrana. Nesse caso, não é possível a ocorrência de rearranjos na membrana a partir da interação com o ligante. Os receptores unipasso, como os receptores tirosina-cinase, tendem a dimerizar quando interagem com o ligante, o que faz com que seus domínios enzimáticos intracelulares se aproximem, podendo, então, ocorrer a fosforilação mútua e a consequente ativação (Figura R16-17B).

RESPOSTA 16-18 A ativação em ambos os casos depende de proteínas que catalisem a troca GDP-GTP na proteína G ou na proteína Ras. Enquanto os próprios receptores associados à proteína G realizam essa função, os receptores associados a enzimas reúnem múltiplas proteínas adaptadoras em um complexo de sinalização, quando os receptores são ativados por fosforilação, e um desses adaptadores recruta uma proteína ativadora de Ras que catalisa a troca.

RESPOSTA 16-19 Visto que a concentração intracelular de Ca^{2+} é muito baixa, um influxo de relativamente poucos íons leva a grandes mudanças na sua concentração citosólica. Assim, um aumento de dez vezes pode ser alcançado pelo aumento da concentração na faixa de micromolar, o que seria obtido com muito menos íons do que seriam necessários para mudar significativamente a concentração de um íon muito mais abundante como o Na^{+}. No músculo, uma mudança maior de dez vezes na concentração citosólica do Ca^{2+} pode ser obtida em milissegundos pela liberação do íon dos seus estoques intracelulares no retículo sarcoplasmático, uma tarefa que seria difícil de ser realizada se fossem necessárias mudanças na faixa de milimolar.

RESPOSTA 16 -20 Em um organismo multicelular como um animal, é importante que as células sobrevivam somente quando e onde forem necessárias. Tornar as células dependentes de sinais de outras células pode ser uma maneira simples de garantir isso. Uma célula colocada em lugar errado, por exemplo, provavelmente, poderia não receber os sinais de sobrevivência necessários (pois suas vizinhas não seriam as corretas) e se ma-

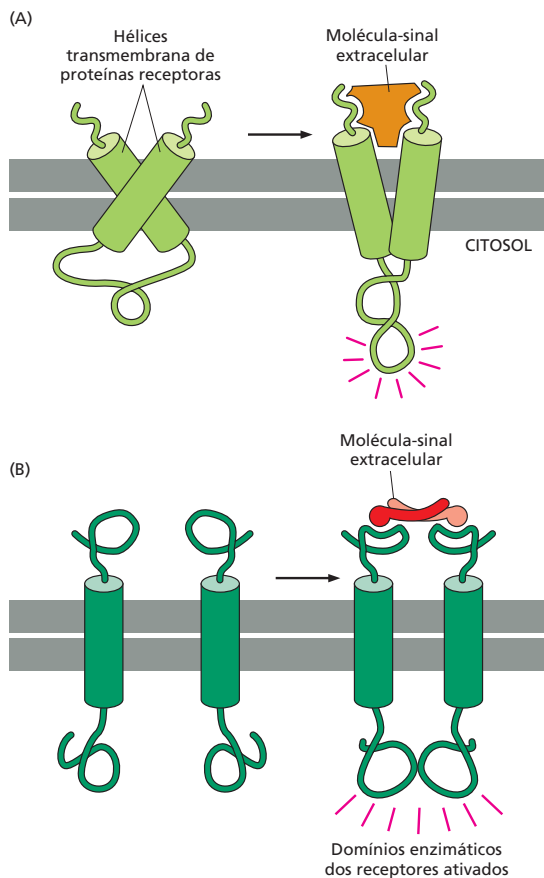



Figura R16-17

taria. Essa estratégia poder ser útil também na regulação do número de células: se a célula do tipo A depende de um sinal de sobrevivência enviado pela célula do tipo B, o número de células B poderia controlar o número de células A pela produção de uma quantidade limitada do sinal de sobrevivência, de modo que somente um determinado número de células A pudesse sobreviver. De fato, existem evidências da existência desse mecanismo de regulação do número de células – tanto nos tecidos em desenvolvimento quanto nos adultos (ver Figura 18-41).

RESPOSTA 16-21 Os canais de Ca^{2+} ativados por Ca^{2+} criam um circuito de retroalimentação positiva: quanto mais Ca^{2+} é liberado, mais canais se abrem. Por essa razão, o sinal de Ca^{2+} no citosol é propagado de forma explosiva por toda a célula muscular, assegurando, assim, que todos os filamentos miosina-actina se contraiam quase sincronicamente.

RESPOSTA 16-22 K2 ativa K1. Se K1 for ativado de maneira permanente, é observada uma resposta independentemente da condição de K2. Se a ordem for invertida, K1 necessitaria ativar K2, o que não pode acontecer, porque, no nosso exemplo, K2 possui uma mutação inativante.

RESPOSTA 16-23

A. Três exemplos de vias de sinalização estendidas para o núcleo são (1) sinal extracelular → receptor tirosina-cinase → proteína adaptadora → proteína ativadora de Ras → MAP-cinase-cinase-cinase → MAP-cinase-cinase → MAP-cinase → regulador de transcrição; (2) sinal extracelular → receptor associado à proteína G → proteína G → fosfolipase C → IP_3 → Ca^{2+} → calmodulina → CaM-cinase→ regulador de transcrição: (3) sinal extracelular → receptor associado à proteína G → proteína G → adenilato-ciclase → AMP cíclico → PKA → regulador de transcrição.

B. Dois exemplos de vias de sinalização diretas para o núcleo são (1) citocina → receptor de citocina → JAK-cinase → STAT; (2) Delta →Notch → cauda de Notch clivada → transcrição.

RESPOSTA 16-24 Quando a PI-3-cinase é ativada por um receptor tirosina-cinase ativado, ela fosforila um fosfolipídeo de inositol específico na membrana plasmática. Esse então recruta, para a membrana, Akt e outra proteína-cinase que auxilia na fosforilação e ativação da Akt. Uma terceira cinase que está associada permanentemente à membrana também auxilia na ativação de Akt (ver Figura 16-33).

RESPOSTA 16-25 Acredita-se que animais e plantas tenham evoluído para a multicelularidade independentemente, e, por isso, se espera que tenham desenvolvido alguns mecanismos de sinalização distintos para a comunicação entre as células. Por outro lado, considera-se que as células animais e vegetais tenham evoluído de uma célula eucariótica ancestral, de modo que se esperaria que as plantas e os animais compartilhassem alguns mecanismos de sinalização intracelular que o ancestral utilizava para responder ao seu meio ambiente.

CAPÍTULO 17

RESPOSTA 17-1 Células que migram rapidamente de um lugar para outro, como as amebas (A) e os espermatozoides (F), geralmente não necessitam de filamentos intermediários em seu citoplasma, visto que não desenvolvem ou são submetidos a grandes forças de tensão. Células vegetais (G) são submetidas constantemente às forças do vento e da água, mas resistem a essas forças por intermédio de suas paredes celulares rígidas, em vez de utilizarem seu citoesqueleto. Células epiteliais (B), células da musculatura lisa (C) e os longos axônios de neurônios (E) são exemplos de células ricas em filamentos intermediários citoplasmáticos, os quais evitam que elas se rompam quando são distendidas ou comprimidas pelos movimentos dos tecidos adjacentes.

Todas as células eucarióticas listadas possuem filamentos intermediários, pelo menos em sua lâmina nuclear. As bactérias, como é o caso da *Escherichia coli* (D), no entanto, não possuem qualquer filamento intermediário.

RESPOSTA 17-2 Dois dímeros de tubulina possuem uma menor afinidade um em relação ao outro (em virtude de um número mais limitado de sítios de interações) do que um dímero de tubulina em relação à extremidade de um microtúbulo (onde existem vários sítios possíveis de interação, tanto no caso de adição de dímeros de tubulina em um protofilamento extremidade a extremidade quanto no que se refere às interações laterais dos dímeros de tubulina com subunidades de tubulina presentes em protofilamentos adjacentes, o que dá origem à forma semelhante a um anel do microtúbulo em secção).

Assim, para que seja iniciada a formação de um microtúbulo a partir do nada, uma quantidade suficiente de dímeros de tubulina deve ser agrupada e permanecer tempo suficiente em união para que novas moléculas de tubulina sejam adicionadas

a esse grupo inicial. Apenas quando uma quantidade suficiente de dímeros de tubulina tiver sido adicionada é que a ligação de uma nova subunidade será favorecida. A formação desses "sítios de nucleação" iniciais, por consequência, é rara e não ocorrerá espontaneamente sob as concentrações celulares normais de tubulina.

Os centrossomos contêm anéis de γ-tubulina pré-organizados (nos quais as subunidades de γ-tubulina são mantidas em união por meio de interações laterais muito mais fortes do que as interações que podem ser formadas pela αβ-tubulina) aos quais os dímeros de αβ-tubulina podem ligar-se. As condições de ligação dos dímeros de αβ-tubulina se assemelham àquelas relativas à adição na extremidade de um microtúbulo organizado. Os anéis de γ-tubulina no centrossomo podem, portanto, ser considerados como sítios de nucleação permanentemente pré-associados.

RESPOSTA 17-3

A. O microtúbulo está encurtando, pois perdeu sua capa de GTP, isto é, as subunidades de tubulina de sua extremidade estão todas sob a forma ligada a GDP. Subunidades de tubulina associadas a GTP, presentes na solução, ainda serão adicionadas a essa extremidade, mas terão uma vida curta – ou porque hidrolisarão seu GTP ou porque serão perdidas conforme as bordas adjacentes do microtúbulo se dissociarem. Se, no entanto, subunidades carregadas com GTP forem adicionadas suficientemente rápido que cheguem a cobrir as subunidades de tubulina que contêm GDP sobre a extremidade do microtúbulo, então uma nova capa de GTP poderá se formar, e o crescimento será novamente favorecido.
B. A taxa de adição de tubulina GTP será maior sob concentrações maiores de tubulina. A frequência com que microtúbulos encurtando começam a crescer aumentará em relação direta ao aumento das concentrações de tubulina. A consequência disso é que o sistema é autorregulável: quanto mais microtúbulos sofrerem encurtamento (levando a uma maior concentração de tubulina livre), mais frequentemente os microtúbulos começarão de novo a crescer. De forma inversa, quanto mais microtúbulos estiverem em crescimento, mais baixas ficarão as concentrações de tubulina livre, e a taxa de adição de tubulina-GTP será diminuída. Em um determinado momento, a hidrólise de GTP alcançará a tubulina-GTP recentemente adicionada, a capa de GTP será destruída, e o microtúbulo reverterá para um estado de encurtamento.
C. Se apenas GDP estiver presente, os microtúbulos continuarão a diminuir e finalmente desaparecerão, pois dímeros de tubulina com GDP possuem uma afinidade muito baixa uns em relação aos outros e não serão estavelmente adicionados aos microtúbulos.
D. Se GTP está presente, mas não pode ser hidrolisado, os microtúbulos continuarão a crescer até o esgotamento completo das subunidades livres de tubulina disponíveis.

RESPOSTA 17-4 Se todos os braços de dineína estiverem igualmente ativos, não poderá ocorrer movimento relativo significante de um microtúbulo em relação a outro, como é necessário para que ocorra flexão (imagine um círculo composto por nove levantadores de peso que querem erguer do solo seu companheiro adjacente, se todos conseguissem fazê-lo, o grupo deveria levitar!). Assim, algumas poucas moléculas de dineína ciliar devem ser seletivamente ativadas em um lado do cílio. Conforme elas movem os microtúbulos adjacentes em direção à extremidade do cílio, esse se flexiona na direção contrária à lateral que contém as dineínas ativadas.

RESPOSTA 17-5 Qualquer proteína de ligação à actina que estabilize complexos de dois ou mais monômeros de actina sem bloquear as extremidades necessárias para o crescimento do filamento facilitará a iniciação de um novo filamento (nucleação).

RESPOSTA 17-6 Apenas moléculas de actina fluorescente organizadas em filamentos são visíveis, pois as moléculas de actina não polimerizadas difundem tão rapidamente que formam um *background* uniforme e difuso. Visto que, no experimento, poucas moléculas de actina estão marcadas (1:10.000), deve existir no máximo um monômero de actina marcada por filamento (ver Figura 17-29) O lamelipódio, como um todo, possui muitos filamentos de actina, alguns dos quais se sobrepõem e consequentemente serão visualizados como um padrão aleatório de pequenos pontos de moléculas de actina, cada uma marcando um filamento diferente.

Essa técnica (que pode ser chamada de "fluorescência particulada") pode ser usada para acompanhar o movimento da actina polimerizada em células em migração. Se você observar esse padrão ao longo do tempo, verá que pontos individuais de fluorescência se moverão para trás em relação à borda anterior, rumo ao interior da célula, um movimento que independe de a célula estar em movimento. Esse movimento retrógrado ocorre porque monômeros de actina são adicionados aos filamentos em suas extremidades mais (+), sendo perdidos nas extremidades menos (-) (onde estão sendo despolimerizados) (ver Figura 17-34B). Os monômeros de actina "se movem ao longo" dos filamentos de actina, um fenômeno denominado *treadmilling*. Foi demonstrado que o *treadmilling* ocorre tanto em filamentos de actina isolados em solução quanto em microtúbulos dinâmicos, como aqueles presentes em um fuso mitótico.

RESPOSTA 17-7 As células contêm proteínas de ligação à actina que enfeixam e interligam os filamentos de actina (ver Figura 17-31). Os filamentos que se estendem a partir de lamelipódios e filopódios se tornam firmemente conectados à rede de filamentos do córtex celular, o que fornece a ancoragem mecânica necessária para que os filamentos em crescimento, semelhantes a bastões, deformem a membrana celular.

RESPOSTA 17-8 Apesar de as subunidades serem de fato mantidas unidas por meio de ligações não covalentes que são individualmente fracas, existe um grande número dessas ligações distribuído entre um número extremamente grande de filamentos. Como resultado, o estresse exercido pela elevação de um objeto pesado por um ser humano sofre dispersão entre tantas subunidades que sua resistência de interação não é excedida. Por analogia, um único fio de seda não é suficientemente resistente para sustentar um ser humano; no entanto, uma corda tecida a partir de fios de seda poderá desempenhar essa tarefa.

RESPOSTA 17-9 Ambos os filamentos são compostos por subunidades na forma de dímeros proteicos que são mantidos em união por meio de interações de supertorção. Além disso, em ambos casos, os dímeros polimerizam através de seus domínios supertorcidos formando filamentos. No entanto, ao passo que dímeros de filamentos intermediários se associam cabeça a cabeça, consequentemente criando um filamento que não apresenta polaridade, todas as moléculas da mesma metade de um filamento de miosina estão orientadas com suas cabeças apontando para a mesma direção. Essa polaridade é necessária para que elas sejam capazes de desenvolver a força contrátil no músculo.

RESPOSTA 17-10

A. As moléculas sucessivas de actina sobre um filamento de actina são idênticas em posição e conformação. Após a ligação inicial de uma proteína (como a troponina) sobre o filamento de actina, não seria possível que uma segunda molécula dessa proteína pudesse reconhecer exatamente o sétimo monômero sobre um filamento de actina nu. A tropomiosina, no entanto, se liga sobre um filamento de actina abarcando exatamente sete monômeros e, desse modo, fornece uma "régua" molecular que mede o comprimento de sete monômeros de actina. A troponina se torna posicionada por meio da ligação à extremidade das moléculas de tropomiosina, a qual está regularmente espaçada.

B. Íons de cálcio influenciam a geração de força no sistema actina-miosina apenas se ambas, troponina (para ligar os íons cálcio) e tropomiosina (para transmitir a informação ao filamento de actina que a troponina possui cálcio associado), estiverem presentes. (i) A troponina não pode ligar-se à actina na ausência de tropomiosina. O filamento de actina ficará permanentemente exposto à miosina, e o sistema estará ativo de forma contínua, independentemente da presença ou da ausência de íons cálcio (uma célula muscular estará, por consequência, permanentemente contraída, sem que haja possibilidade de regulação). (ii) A tropomiosina irá ligar-se à actina e bloquear completamente a ligação da miosina; o sistema ficará permanentemente inativo, independentemente da presença de cálcio, visto que a tropomiosina não é afetada diretamente por cálcio. (iii) O sistema irá contrair em resposta aos íons cálcio.

RESPOSTA 17-11

A. Verdadeiro. Um movimento contínuo do RE rumo à periferia é necessário; na ausência de microtúbulos, o RE colapsa em direção ao centro da célula.

B. Verdadeiro. A actina é necessária para a produção do anel contrátil que provoca a clivagem física entre as duas células-filhas, ao passo que o fuso mitótico que separa os cromossomos é composto por microtúbulos.

C. Verdadeiro. Ambas as extensões estão associadas a proteínas transmembrana que formam protrusões a partir da membrana plasmática e permitem que a célula forme novos pontos de ancoragem sobre o substrato.

D. Falso. Para provocar a flexão, ATP é hidrolisado pelas proteínas motoras dineína que estão ligadas ao microtúbulos mais externos no flagelo.

E. Falso. As células não podem dividir-se sem que ocorram rearranjos de seus filamentos intermediários; no entanto, muitas células em diferenciação terminal e células de longa duração, como neurônios, possuem filamentos intermediários estáveis que, até o momento, não foram observados em despolimerização.

F. Falso. A taxa de crescimento é independente do tamanho da capa de GTP. As extremidades mais (+) e menos (-) apresentam diferentes taxas de crescimento, pois possuem sítios de ligação fisicamente distintos para a adição de subunidades de tubulina; a taxa de adição de tubulina difere entre as duas extremidades.

G. Verdadeiro. Ambos são belos exemplos de como a mesma membrana pode apresentar regiões altamente especializadas para uma função determinada.

H. Falso. O movimento da miosina é ativado pela fosforilação da miosina ou pela ligação de cálcio à troponina.

RESPOSTA 17-12 O tempo médio necessário para que uma pequena molécula (como o ATP) difunda através de uma distância de 10 μm é dado pelo seguinte cálculo:

$$(10^{-3})^2/(2 \times 5 \times 10^{-6}) = 0{,}1 \text{ segundo}$$

De forma semelhante, uma proteína necessitaria de 1 segundo, e uma vesícula, de 10 segundos, em média, para percorrer 10 μm. Uma vesícula necessitaria em média de 10^9 segundos, ou mais de 30 anos, para difundir até a extremidade de um axônio de 10 cm de comprimento. Esse valor torna óbvia a necessidade da evolução das cinesinas e de outras proteínas motoras para carrear moléculas e organelas sobre os microtúbulos.

RESPOSTA 17-13 (1) Células animais são muito maiores e apresentam formato muito mais diversificado, além de não possuírem parede celular. Os elementos do citoesqueleto são necessários para fornecer resistência mecânica e formato em ausência de uma parede celular. (2) Células animais, e todas as demais células eucarióticas, possuem um núcleo cuja morfologia e posição dentro da célula são mantidas pelos filamentos intermediários; as laminas nucleares conectadas à membrana nuclear interna sustentam e dão forma à membrana nuclear, e uma rede de filamentos intermediários reveste o núcleo e se estende no citosol. (3) Células animais podem movimentar-se por meio de um processo que requer alteração na morfologia. Os filamentos de actina e a proteína motora miosina são necessários para essas atividades. (4) Células animais possuem um genoma muito maior do que células bacterianas; este genoma está fragmentado em diversos cromossomos. Na divisão celular, os cromossomos devem ser exatamente distribuídos entre as células-filhas, o que requer a atuação dos microtúbulos que formam o fuso mitótico. (5) Células animais possuem organelas internas. O posicionamento dessas na célula é dependente de proteínas motoras que se movem ao longo dos microtúbulos. Um excepcional exemplo é o transporte a longas distâncias de vesículas delimitadas por membrana (organelas) sobre os microtúbulos em um axônio que pode ter um comprimento de até 1 metro, no caso dos neurônios que se estendem da medula espinal rumo aos nossos pés.

RESPOSTA 17-14 As extremidades de um filamento intermediário não são distinguíveis entre elas, pois os filamentos são montados a partir da associação de tetrâmeros simétricos feitos de dois dímeros supertorcidos. Assim, contrastando aos microtúbulos e aos filamentos de actina, os filamentos intermediários não apresentam polaridade.

RESPOSTA 17-15 Os filamentos intermediários não apresentam polaridade; suas extremidades são quimicamente idênticas. Seria, portanto, difícil imaginar como uma proteína motora hipotética que se ligasse em uma região central de um filamento poderia identificar e definir uma direção. Tal proteína motora seria igualmente capaz de se ligar ao filamento e rumar para qualquer das extremidades.

RESPOSTA 17-16 A catanina quebra os microtúbulos em fragmentos, ao longo de seu comprimento e em posições distantes de suas capas GTP. Os fragmentos formados possuem, portanto, tubulina-GDP em suas extremidades expostas e rapidamente sofrem despolimerização. Desse modo, a catanina fornece uma possibilidade de rápida destruição dos microtúbulos existentes.

RESPOSTA 17-17 A divisão celular depende da capacidade de os microtúbulos polimerizarem e despolimerizarem. Isso se torna mais evidente quando consideramos que a formação do fuso mitótico requer a despolimerização prévia de outros microtúbulos celulares para a disponibilização da tubulina livre necessária para a construção do fuso. Essa reorganização não é possível

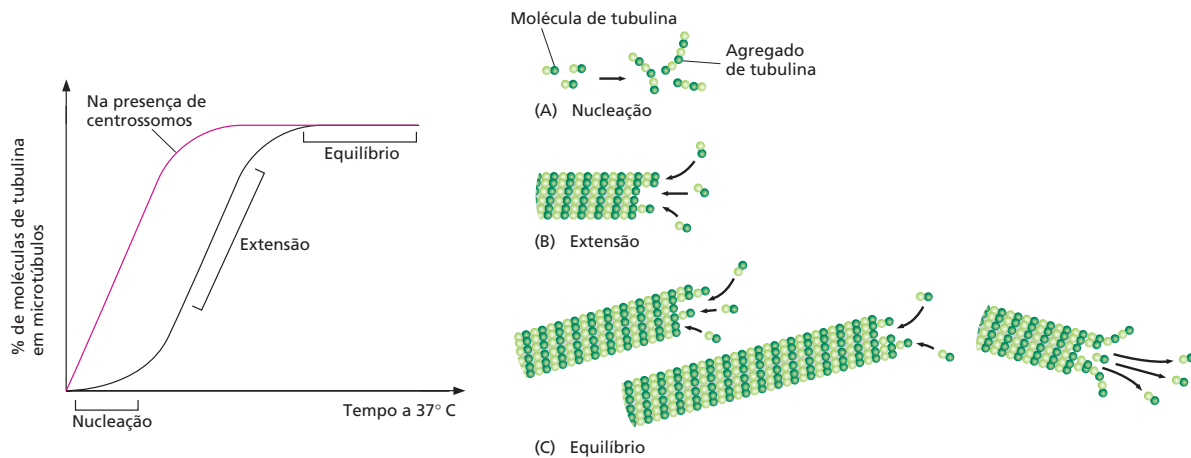



Figura R17-19

em células tratadas com taxol, ao passo que em células tratadas com colchicina, a divisão é bloqueada em virtude da impossibilidade de montagem do fuso. Em um nível mais sutil, mas não menos importante, ambos os fármacos bloqueiam a instabilidade dinâmica dos microtúbulos e, por consequência interferem no desempenho do fuso mitótico, mesmo se ele houvesse sido adequadamente montado.

RESPOSTA 17-18 As proteínas motoras são unidirecionais em sua ação. As cinesinas sempre se movem rumo à extremidade mais (+) de um microtúbulo, e as dineínas, rumo à extremidade menos (-). Assim, se moléculas de cinesina são aderidas ao vidro, apenas aqueles motores individuais que apresentam a correta orientação em relação ao microtúbulo que é sobre eles colocado poderão se ligar a ele e exercer força de modo a impulsioná-lo. Visto que as cinesinas se movem rumo à extremidade mais (+) do microtúbulo, esse sempre migrará levando sua extremidade menos (-) à frente, sobre a lamínula.

RESPOSTA 17-19

A. A fase A corresponde a uma fase de intervalo, durante a qual as moléculas de tubulina se agrupam para a formação de centros de nucleação (**Figura R17-19A**). A nucleação é seguida por uma rápida elevação (fase B) até um valor de platô, conforme os dímeros de tubulina são adicionados às extremidades dos microtúbulos em crescimento (Figura R17-19B). Na fase C, é alcançado o equilíbrio, onde alguns microtúbulos na população estão em crescimento, outros estão encurtando rapidamente (Figura R17-19C). A concentração de tubulina livre é constante nesse ponto, pois a polimerização e a despolimerização estão balanceadas (ver também Questão 17-3, p. 583).
B. A adição de centrossomos induz sítios de nucleação que eliminam a fase de intervalo A conforme ilustrado na curva vermelha da Figura R17-19. A velocidade de crescimento dos microtúbulos (isto é, a inclinação da curva na fase B de extensão) e o patamar de equilíbrio de tubulina livre permanecem inalterados, pois a presença de centrossomos não afeta as taxas de polimerização ou despolimerização.

RESPOSTA 17-20 As extremidades do microtúbulo que está encurtando estão visivelmente esfiapadas, e os protofilamentos individualmente parecem separar-se e sofrer enrolamento conforme suas extremidades sofrem despolimerização. Assim, essa microfotografia sugere que a capa de GTP (a qual é perdido nos microtúbulos que estão encurtando) mantém os protofilamentos adequadamente alinhados uns com os outros, talvez pelo fortalecimento das interações laterais entre as subunidades αβ-tubulina quando essas se encontram sob a forma ligada a GTP.

RESPOSTA 17-21 A citocalasina interfere na formação do filamento de actina, e seu efeito sobre a célula demonstra a importância da actina para a locomoção celular. O experimento com colchicina mostra que os microtúbulos são necessários para dar uma polaridade à célula, que, então, determina qual extremidade corresponderá à borda anterior (ver Figura 17-13). Na ausência de microtúbulos, as células ainda são capazes de realizar os movimentos normalmente associados à locomoção celular, como a extensão de lamelipódios. No entanto, na ausência de polaridade, esses serão exercícios inúteis, pois ocorrerão indiscriminadamente em todas as direções.

Anticorpos se ligam fortemente ao antígeno correspondente (nesse caso, a vimentina) (ver Painel 4-3, p. 144-145). Quando ligado, um anticorpo pode interferir no funcionamento do antígeno, impedindo-o de interagir adequadamente com outros componentes celulares. Portanto, o experimento de injeção de anticorpos sugere que os filamentos intermediários não são necessários nem para a manutenção da polaridade celular nem para a maquinaria motriz.

RESPOSTA 17-22 Tanto (B) quanto (C) podem completar corretamente a sentença. O resultado direto do potencial de ação em uma membrana plasmática é a liberação de Ca^{2+} no citosol a partir do retículo sarcoplasmático. Células musculares são induzidas a contrair por essa rápida elevação de Ca^{2+} citosólico. Os íons de cálcio em altas concentrações se ligam à troponina, o que, por sua vez, faz com que a tropomiosina se mova e exponha os sítios de ligação à miosina sobre os filamentos de actina. (A) e (D) estão erradas, pois o Ca^{2+} não possui efeito sobre a dissociação da cabeça de miosina do filamento de actina, o que é resultado da hidrólise de ATP. Também não existe qualquer papel de Ca^{2+} na manutenção da estrutura do filamento de miosina.

RESPOSTA 17-23 Apenas (D) está correta. Sob contração, os discos Z se aproximam e nem os filamentos de actina nem os de miosina contraem (ver Figuras 17-41 e 17-42).

CAPÍTULO 18

RESPOSTA 18-1 Como todas as células surgem por divisão a partir de outra célula, essa afirmação está correta assumindo que "primeira divisão celular" se refere à divisão, com sucesso, da célula matriz a partir da qual toda vida que conhecemos derivou. Provavelmente existiram várias outras tentativas sem sucesso para iniciar a cadeia da vida.

RESPOSTA 18-2 Células no pico B contêm o dobro de DNA do que aquelas no pico A, indicando que elas contêm DNA replicado, ao passo que as células no pico A contêm DNA não replicado. Entretanto, o pico A contém células que estão em G_1, e o pico B contêm células que estão em G_2 e mitose. As células na fase S começaram, mas não terminaram, a síntese de DNA. Portanto, elas têm várias quantidades intermediárias de DNA e são encontradas na região entre os dois picos. A maioria das células está em G_1, indicando que essa é a fase mais longa do ciclo celular (ver Figura 18-2).

RESPOSTA 18-3 Para organismos multicelulares, o controle de divisão celular é extremamente importante. Células individuais não devem proliferar, a não ser que seja para benefício de todo o organismo. O estado G_0 oferece proteção contra ativação aberrante da divisão celular, pois o sistema de controle do ciclo celular é muito desmantelado. Se, por outro lado, uma célula recém parou em G_1, ela ainda conteria todo o sistema de controle do ciclo celular e poderia ser induzida a se dividir. A célula também teria de refazer a "decisão" de não se dividir quase que continuamente. Para entrar de novo no ciclo celular a partir de G_0, uma célula deve sintetizar novamente todos os componentes que desapareceram.

RESPOSTA 18-4 A célula replicaria o seu DNA danificado e, por isso, introduziria mutações nas duas células-filhas, quando a célula se dividisse. Essas mutações poderiam aumentar as chances da progênie das células-filhas afetadas de finalmente se tornarem células cancerosas.

RESPOSTA 18-5 Antes da injeção, os oócitos de sapo devem conter M-Cdk inativa. Após a injeção do citoplasma na fase M, a pequena quantidade de M-Cdk ativa no citoplasma injetado ativa as M-Cdk inativas, ativando a fosfatase ativadora (Cdc 25), que remove os grupos fosfato inibidores da M-Cdk inativa (ver Figura 18-17). Um extrato do segundo oócito, agora na fase M, conterá tantas M-Cdks ativas quanto o extrato citoplasmático original, e assim por diante.

RESPOSTA 18-6 O experimento mostra que os cinetocoros não estão conectados a um ou outro polo do fuso; os microtúbulos se ligam aos cinetocoros que são capazes de alcançar. Entretanto, para que os cromossomos permaneçam ligados a um microtúbulo, uma tensão deve ser exercida. A tensão é, normalmente, atingida pelas forças opostas dos polos do fuso. A necessidade de tal tensão assegura que, se dois cinetocoros-irmãos se ligarem ao mesmo polo do fuso, de modo que não haja geração de tensão, uma ou as duas conexões serão perdidas, e os microtúbulos dos polos dos fusos opostos terão outra chance de se ligar de forma apropriada.

RESPOSTA 18-7 Lembre-se da Figura 18-31 que o novo envelope nuclear é formado na superfície dos cromossomos. Uma sobreposição muito próxima do envelope com os cromossomos impede o aprisionamento das proteínas citosólicas entre os cromossomos e o envelope. As proteínas nucleares são, então, seletivamente importadas pelos poros nucleares, causando a expansão do núcleo e mantendo a composição proteica característica.

RESPOSTA 18-8 As membranas das vesículas de Golgi se fusionam para formar parte das membranas plasmáticas das duas células-filhas. Os interiores das vesículas, que estão preenchidos com material da parede celular, tornam-se a nova matriz da parede celular que separa as duas células-filhas. As proteínas da membrana das vesículas de Golgi se tornam as proteínas da membrana plasmática. Aquelas porções da proteína que estão voltadas para o lúmen da vesícula de Golgi terminarão expostas a nova parede celular (**Figura R18-8**).

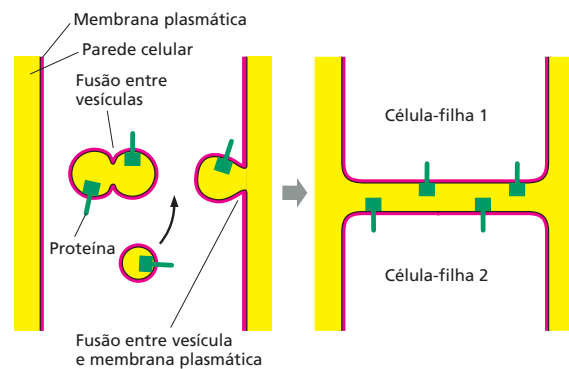



Figura R18-8

RESPOSTA 18-9 Em um organismo eucariótico, a informação genética de que o organismo necessita para sobreviver e reproduzir está distribuída entre os múltiplos cromossomos. Portanto, é crucial que cada célula-filha receba uma cópia de cada cromossomo quando a célula se divide. Se a célula-filha receber menos ou mais cromossomos, os efeitos são, normalmente, deletérios, ou mesmo letais. Somente duas cópias de cada cromossomo são produzidas pela replicação na mitose. Se a célula distribuísse os cromossomos ao acaso no momento da divisão, seria pouco provável que cada célula recebesse precisamente uma cópia de cada cromossomo. Por outro lado, o aparelho de Golgi se fragmenta em minúsculas vesículas, todas similares, e, pela distribuição ao acaso, é muito provável que cada célula-filha receba um número aproximadamente igual dessas vesículas.

RESPOSTA 18-10 Como a apoptose ocorre em ampla escala tanto nos tecidos em desenvolvimento quanto no adulto, ela não deve acionar reações de alarme que normalmente estão associadas ao dano celular. O dano tecidual, por exemplo, leva à liberação de moléculas-sinal que estimulam a proliferação de células vizinhas de modo que a ferida cicatrize. Ele também causa a liberação de sinais que podem causar uma reação inflamatória destrutiva. Além disso, a liberação do conteúdo intracelular poderia produzir uma resposta imune contra moléculas que normalmente não são encontradas pelo sistema imune. Tais reações seriam autodestrutivas se elas ocorressem em resposta à morte celular massiva que ocorre no desenvolvimento normal.

RESPOSTA 18-11 Como a população celular cresce de forma exponencial, duplicando seu peso a cada divisão celular, o peso de um grupo de células após N divisões celulares é $2^N \times 10^{-9}$ g. Portanto, 70 kg (70×10^3 g) $= 2^N \times 10^{-9}$ g, ou $2^N = 7 \times 10^{13}$. Tomando o logaritmo de ambos os lados, pode-se solucionar a equação para N. Portanto, $N = \ln (7 \times 10^{13})/\ln 2 = 46$; isto é, leva-

ria apenas 46 dias se as células proliferassem exponencialmente. A divisão celular nos animais é rigidamente controlada. Entretanto, a maioria das células do organismo humano para de dividir quando se torna altamente especializada. O exemplo demonstra que a proliferação celular exponencial ocorre somente por períodos breves, mesmo durante o período embrionário.

RESPOSTA 18-12 Muitas células-ovo são grandes e contêm componentes celulares armazenados em número suficiente para muitas divisões celulares. As células-filhas que se formam durante a primeira divisão celular após a fertilização são progressivamente menores em tamanho e assim podem ser formadas sem a necessidade de novas proteínas ou síntese de RNA. Visto que as células normais em divisão continuarão crescendo continuamente nas fases G_1, G_2 e S até que tenham dobrado de tamanho, não há crescimento celular nessas divisões iniciais, e tanto G_1 quanto G_2 estão praticamente ausentes. Como G_1 em geral é mais longa do que G_2, G_1 é drasticamente reduzida nessas divisões.

RESPOSTA 18-13

A. Radiação leva ao dano a DNA, que ativa um mecanismo de ponto de verificação (mediado por p53 e p21; ver Figura 18-16) que interrompe o ciclo celular até que o DNA tenha sido reparado.
B. A célula replicará o DNA danificado e assim introduzirá mutações nas células-filhas quando a célula se dividir.
C. A célula será capaz de se dividir normalmente, mas ela estará suscetível a mutações, pois algum dano no DNA sempre ocorre como resultado da irradiação natural causada, por exemplo, por raios cósmicos. O mecanismo de ponto de verificação mediado por p53 é necessário principalmente como uma segurança contra os efeitos devastadores do acúmulo de danos no DNA, mas não para o avanço natural do ciclo celular nas células não danificadas.
D. A divisão celular em humanos é um processo progressivo que não cessa até alcançar a maturidade e é necessário para a sobrevivência. Eritrócitos e células epiteliais na pele ou revestindo o intestino, por exemplo, estão constantemente sendo produzidos pela divisão celular para abastecer as necessidades do corpo. A cada dia, seu corpo produz cerca de 10^{11} novos eritrócitos.

RESPOSTA 18-14

A. Apenas as células que estavam na fase S do seu ciclo celular (isto é, aquelas células produzindo DNA) durante os 30 minutos de marcação contêm DNA radioativo.
B. Inicialmente, células mitóticas contêm DNA não radioativo, pois essas células não estavam engajadas na síntese de DNA durante o período de marcação. Na verdade, leva em torno de duas horas antes que a primeira célula mitótica marcada apareça.
C. O aumento inicial da curva corresponde às células que estavam recém terminando a replicação do DNA quando a timidina radioativa foi adicionada. A curva aumenta mais à medida mais células marcadas entram em mitose; o pico corresponde àquelas células que recém começaram a fase S quando a timidina radioativa foi adicionada. As células marcadas então saem da mitose e são substituídas por células mitóticas não marcadas, que ainda não estavam na fase S durante o período de marcação. Após 20 horas, a curva começa a aumentar novamente, pois as células marcadas entram na sua segunda rodada de mitose.
D. As primeiras duas horas de intervalo antes que qualquer célula mitótica marcada apareça correspondem à fase G_2, que é o tempo entre o final da fase S e o início da mitose. As primeiras células marcadas vistas na mitose são aquelas que estavam recém terminando a fase S (síntese de DNA) quando a timidina radioativa foi adicionada.

RESPOSTA 18-15 A perda de M-ciclina leva à inativação de M-Cdk. Como resultado, suas proteínas-alvo se tornam desfosforiladas por fosfatases, e as células saem da mitose: elas desmontam o fuso mitótico, montam novamente o envelope nuclear, descondensam seus cromossomos e assim por diante. A M-ciclina é degradada pela destruição dependente da ubiquitina nos proteassomos, e a ativação de M-Cdk leva à ativação de APC, que ubiquitina a ciclina, mas com um atraso substancial. Como discutido no Capítulo 7, a ubiquitilação marca as proteínas para serem degradadas nos proteassomos.

RESPOSTA 18-16 A M-ciclina se acumula de forma gradual à medida que ela é constantemente sintetizada. À medida que ela se acumula, ela tende a formar complexos com as moléculas Cdk mitóticas que estão presentes. Depois de certo nível mínimo ter sido alcançado, uma quantidade suficiente de M-Cdk foi formada, de modo que ela é ativada pelas cinases e fosfatases apropriadas que a fosforilam e desfosforilam. Uma vez ativada, M-Cdk atua para aumentar a atividade da fosfatase ativadora; essa retroalimentação positiva conduz a uma ativação explosiva de M-Cdk (ver Figura 18-18). Assim, o acúmulo de M-ciclina atua como um estopim queimando de forma lenta, o que finalmente auxilia a acionar a autoativação explosiva de M-Cdk. A destruição precipitada da M-ciclina termina com a atividade de M-Cdk, e uma nova rodada de acúmulo de M-Cdk inicia.

RESPOSTA 18-17 A ordem é G, C, B, A e D. Juntos, esses cinco passos são referidos como mitose (F). Nenhum passo da mitose é influenciado pelas fases da lua (E). A citocinese é o último passo da fase M, a qual se sobrepõe com a anáfase e a telófase. Tanto a mitose quanto a citocinese fazem parte da fase M.

RESPOSTA 18-18 Se a taxa de crescimento dos microtúbulos é a mesma nas células em interfase e em células mitóticas, sua duração é proporcional ao seu tempo de vida. Assim, o tamanho médio dos microtúbulos na mitose é de 1 μm (= 20 μm × 15 s/300 s).

RESPOSTA 18-19 Como mostra a **Figura R18-19**, a sobreposição dos microtúbulos interpolares dos polos opostos do fuso possui suas extremidades mais (+) apontando em direções opostas. As proteínas motoras que direcionam as extremidades mais (+) fazem ligações cruzadas com os microtúbulos adjacentes antiparalelos e tendem a mover os microtúbulos na direção que irá separar os dois polos do fuso, como mostrado na figura. As proteínas motoras das extremidades menos (-) também fazem ligação cruzada nos microtúbulos adjacentes antiparalelos, mas se movem na direção oposta, tendendo a aproximar os polos do fuso (não mostrado).

RESPOSTA 18-20 Uma cromátide-irmã se torna comprometida quando um microtúbulo de um polo do fuso se liga ao cinetocoro da cromátide. A ligação do microtúbulo é ainda reversível, até que um segundo microtúbulo, do outro polo do fuso, se ligue ao cinetocoro da sua cromátide-irmã parceira, de modo que o cromossomo duplicado fique sob tensão mecânica pelas forças que puxam dos dois polos. A tensão assegura que os dois microtúbulos permaneçam ligados ao cromossomo. A posição da cromátide na célula no momento da quebra do envelope nuclear influenciará para qual polo do fuso a cromátide será pu-

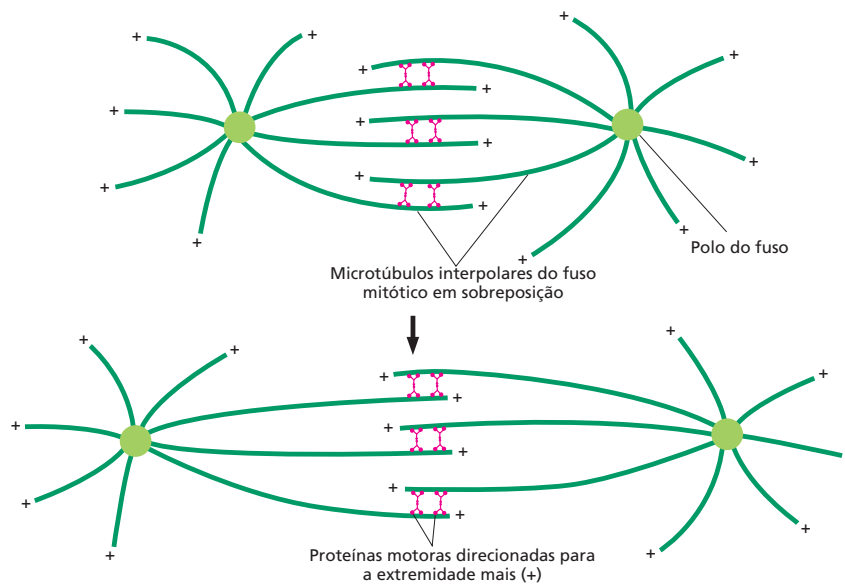



Figura R18-19

xada, pois é provável que o cinetocoro se ligue ao polo do fuso para o qual está voltado.

RESPOSTA 18-21 Não se sabe ao certo como isso ocorre. Em princípio, dois modelos possíveis poderiam explicar como o cinetocoro pode gerar uma força em direção aos polos em seus cromossomos durante a anáfase A, como ilustrado na **Figura R18-21**. Em (A), as proteínas motoras dos microtúbulos são parte do cinetocoro e usam a energia da hidrólise do ATP para puxar os cromossomos ao longo dos microtúbulos a eles ligados. A despolimerização do microtúbulo na extremidade do cinetocoro ocorreria como consequência desse movimento. Em (B), os movimentos dos cromossomos são dirigidos pela dissociação dos microtúbulos catalisada por uma enzima que usa a energia da hidrólise do ATP para remover as subunidades de tubulina das extremidades ligadas ao microtúbulo. As subunidades de tubulina dissociam, e o cinetocoro é obrigado a deslizar na direção dos polos para manter sua ligação às paredes dos microtúbulos. É possível que os dois mecanismos sejam usados, mas evidências atuais favorecem o modelo mostrado em (B).

RESPOSTA 18-22 As duas cromátides-irmãs podem ir para a mesma célula-filha por várias razões. (1) Se os microtúbulos ou suas conexões com o cinetocoro forem desfeitos durante a anáfase, ambas as cromátides poderão ser puxadas para o mesmo polo e, assim, para a mesma célula-filha. (2) Se os microtúbulos do mesmo polo do fuso se ligarem aos dois cinetocoros, os cromossomos serão puxados para o mesmo polo. (3) Se as coesinas que ligam as cromátides-irmãs não forem degradadas, o par de cromátides pode ser puxado para o mesmo polo. (4) Se um cromossomo duplicado nunca for ligado a um microtúbulo e for deixado fora do fuso, ele ficará em uma das células-filhas.

(A) Movimento cromossômico dirigido por ATP orienta o encurtamento do microtúbulo

(B) O encurtamento do microtúbulo dirige os movimentos cromossômicos

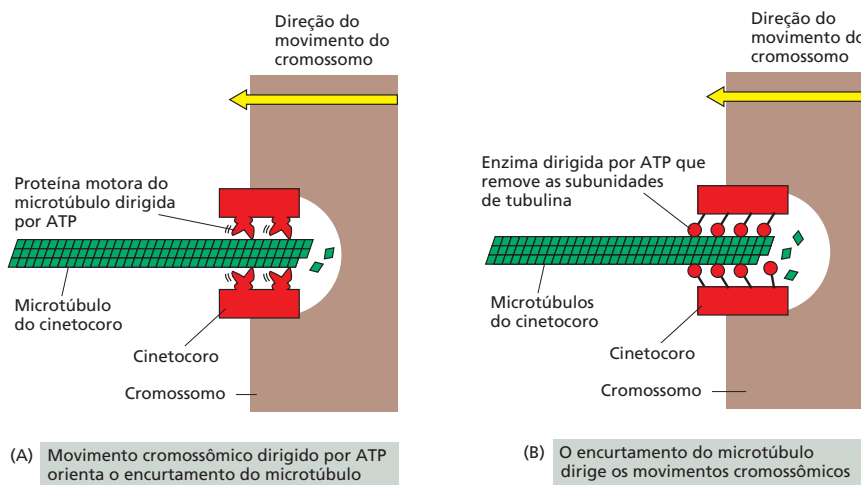



Figure R18-21

Seria esperado que alguns desses erros no processo mitótico ativassem um mecanismo de verificação que retarda o início da anáfase até que todos os cromossomos estejam ligados adequadamente a ambos os polos do fuso. Esse mecanismo de "verificação da formação do fuso" deve permitir que a maioria dos erros de ligação dos cromossomos seja corrigida, o que é uma das razões do por que de esses erros serem raros.

As consequências de duas cromátides-irmãs irem para a mesma célula-filha são, frequentemente, terríveis. Uma célula-filha poderia conter somente uma cópia de todos os genes de um cromossomo, e a outra célula-filha, três cópias. A dose do gene alterado, levando a mudanças na quantidade de mRNA e proteínas produzidas, é, frequentemente, prejudicial para a célula. Além disso, há a possibilidade de que a célula com uma única cópia do cromossomo possa ser defeituosa para um gene importante, um defeito que normalmente estaria encoberto pela presença da cópia boa do gene no outro cromossomo que está faltando.

RESPOSTA 18-23

A. Verdadeiro. Os centrômeros se replicam durante a interfase, antes do início da fase M.
B. Verdadeiro. As cromátides-irmãs se separam somente no início da anáfase.
C. Falso. As extremidades dos microtúbulos interpolares se sobrepõem e se ligam umas às outras por meio das proteínas (incluindo as proteínas motoras) que fazem uma ponte entre os microtúbulos.
D. Falso. Os microtúbulos e suas proteínas motoras não atuam na replicação do DNA.
E. Falso. Para uma afirmação correta, os termos "centrômero" e "centrossomo" devem ser trocados.

RESPOSTA 18-24 O anticorpo se liga fortemente ao antígeno (nesse caso, a miosina), contra o qual foi produzido. Quando ligado, um anticorpo pode interferir na função do antígeno, prevenindo-o de interagir adequadamente com outros componentes celulares. (A) O movimento dos cromossomos na anáfase depende dos microtúbulos e de suas proteínas motoras, e não de actina ou miosina. A injeção de um anticorpo antimiosina na célula não terá efeito no movimento dos cromossomos durante a anáfase. (B) A citocinese, por outro lado, depende da formação e da contração de um anel de filamentos de actina e miosina, os quais formam o sulco de clivagem que divide a célula em duas. A injeção de anticorpos antimiosina irá, portanto, bloquear a citocinese.

RESPOSTA 18-25 A membrana plasmática da célula que morreu por necrose na Figura 18-38A está rompida; uma ruptura clara é visível, por exemplo, na posição que corresponde às 12 horas em um relógio. Observa-se o conteúdo celular, na maior parte restos de membrana e do citoesqueleto, sendo derramado nas imediações através dessas rupturas. O citosol está levemente corado, já que a maioria dos componentes celulares solúveis foi perdida antes que a célula fosse fixada. Ao contrário, a célula que sofreu apoptose na Figura 18-38B está envolta por uma membrana intacta, e o seu citosol está densamente corado, indicando uma concentração normal dos componentes celulares. Entretanto, o interior da célula é notavelmente diferente do de uma célula normal. Particularmente características são as grandes "bolhas" que saem a partir do núcleo, provavelmente como resultado da quebra da lâmina nuclear. O citosol também contém várias vesículas grandes, redondas, de origem desconhecida, envolvidas por membranas, que normalmente não são vistas em células saudáveis. A fotografia confirma visualmente a noção de que necrose envolve lise celular, e as células que sofrem apoptose permanecem relativamente intactas até que sejam digeridas dentro de uma célula normal.

RESPOSTA 18-26

A. Falso. Não existe transição de G_1 para a fase M. Entretanto, a afirmação estaria correta para a transição de G_1 para a fase S, onde as próprias células avançam para o ciclo de divisão.
B. Verdadeiro. A apoptose é um processo ativo realizado por proteases especiais (caspases).
C. Verdadeiro. Acredita-se que esse mecanismo ajuste o número de neurônios ao número de células-alvo específicas com as quais os neurônios se conectam.
D. Verdadeiro. Uma conservação evolutiva incrível!
E. Verdadeiro. Tais estudos empregam as assim denominadas mutações condicionais, que conduzem à produção de proteínas que normalmente são estáveis e funcionais em uma temperatura, mas instáveis ou inativas em outra temperatura. Células podem ser cultivadas a temperaturas nas quais a proteína mutante funciona normalmente, e então podem ser mudadas para uma temperatura na qual a função da proteína é perdida.
F. Verdadeiro. A associação de uma proteína Cdk com uma ciclina é necessária para a sua atividade (por isso, o nome de cinase dependente de ciclina). Além disso, a fosforilação em locais específicos e a desfosforilação em outros locais na proteína Cdk são necessárias para que o complexo ciclina-Cdk seja ativo.

RESPOSTA 18-27 As células em um animal devem comportar-se para o bem do organismo como um todo – em uma extensão muito maior do que as pessoas geralmente agem para o bem da sociedade. No contexto de um organismo, o comportamento não social levaria a uma perda da organização e ao câncer. Várias das regras que as células devem obedecer seriam inaceitáveis em uma sociedade humana. A maioria das pessoas, por exemplo, estaria relutante em se matar para o bem da sociedade, mas as células o fazem todo o tempo.

RESPOSTA 18-28 A abordagem mais provável para o sucesso (se é assim que o objetivo deve ser chamado) é o plano C, que deveria resultar em um aumento no número de células. Claro que o problema é que o número de células de cada tecido deve ser aumentado de forma similar para manter proporções balanceadas no organismo, já que células diferentes respondem a diferentes fatores de crescimento. Entretanto, como mostrado na **Figura R18-28**, a abordagem teve um sucesso limitado. Um camundongo produzindo uma grande quantidade de hormô-

Figura R18-28 Cortesia de Ralph Brinster

nio de crescimento *(à esquerda)* – *o* qual atua para estimular a produção de uma proteína secretada que atua como fator de sobrevivência, fator de crescimento ou mitógeno, dependendo do tipo celular – cresce até quase o dobro do tamanho de um camundongo normal *(à direita)*. Entretanto, para alcançar essa mudança duplicada no tamanho, o hormônio de crescimento foi superproduzido de forma massiva (cerca de 50 vezes mais). Note que um camundongo não chega nem ao tamanho de um rato, muito menos de um cão.

As outras abordagens têm problemas conceituais:

A. O bloqueio da apoptose pode conduzir a defeitos no desenvolvimento, uma vez que o desenvolvimento do rato requer a morte seletiva de várias células. Não é provável que um animal viável fosse obtido.
B. O bloqueio da função de p53 eliminaria um importante ponto de verificação do ciclo celular, que detecta danos no DNA e para o ciclo, de modo que a célula possa reparar o dano; a remoção de p53 aumentaria as taxas de mutação e levaria ao câncer. Camundongos sem p53 em geral se desenvolvem normalmente, mas morrem de câncer ainda jovens.
D. Dadas as circunstâncias, a troca de profissão não seria uma má opção.

RESPOSTA 18-29 Uma liberação limitada de PDGF, por exigência, em um local lesionado aciona a divisão celular de células vizinhas por uma quantidade de tempo limitada, até que a PDGF seja degradada. Isso é diferente da liberação contínua de PDGF a partir de células mutantes, onde PDGF é produzida em altos níveis de forma não controlada. Além disso, as células mutantes que produzem PDGF, muitas vezes de maneira não apropriada, expressam o seu próprio receptor para PDGF, de modo que elas podem estimular a sua própria proliferação, promovendo, assim, o desenvolvimento de câncer.

RESPOSTA 18-30 Todos os três tipos de células mutantes não seriam capazes de se dividir. As células

A. entrariam em mitose, mas não seriam capazes de sair da mitose.
B. iriam ficar permanentemente em G_1, pois os complexos ciclina-Cdk seriam inativados.
C. não seriam capazes de ativar a transcrição dos genes necessários para a divisão celular, pois as proteínas reguladoras dos genes seriam constantemente inibidas pela Rb não fosforilada.

RESPOSTA 18-31 No alcoolismo, as células do fígado proliferam, pois o órgão está muito lesionado, e os danos ocorrem em virtude das grandes quantidades de álcool que devem ser metabolizadas. Essa necessidade por mais células hepáticas ativa os mecanismos de controle que normalmente regulam a proliferação celular. A não ser que esteja muito danificado, o fígado em geral irá encolher-se de volta ao tamanho normal depois que os pacientes pararem de beber excessivamente. Ao contrário, em um tumor no fígado, as mutações abolem o controle da proliferação celular normal, e, como resultado, as células se dividem e se mantêm em divisão de modo descontrolado, o que é fatal.

CAPÍTULO 19

RESPOSTA 19-1 Apesar de cada célula possuir uma quantidade diploide de DNA no final da primeira divisão meiótica, existe efetivamente apenas um conjunto haploide de cromossomos (que estão duplicados) em cada célula, representando apenas um dos homólogos de cada cromossomo (lembre-se, no entanto, de que uma certa mistura já deve ter ocorrido durante o *crossing-over*). Visto que os cromossomos maternos e paternos de um dado par possuirão versões diferentes (alelos diferentes) para a maioria dos genes, essas células-filhas não serão geneticamente idênticas; cada uma delas, portanto, terá perdido ou a versão de origem paterna, ou a versão de origem materna de cada um dos cromossomos. Em contraste, as células somáticas, que se dividem por mitose, herdam um conjunto diploide completo de cromossomos, cada célula-filha é geneticamente idêntica às demais e herda tanto as cópias de genes maternas quanto paternas. A função dos gametas produzidos pela meiose é a de misturar e rearranjar os repertórios de genes durante a reprodução sexuada, e, dessa forma, cada gameta apresenta uma vantagem por possuir uma constituição genética relativamente diferente dos demais. Por outro lado, o papel das células somáticas é o de formar um organismo que contenha os mesmos genes em todas as células e mantenha em cada uma delas tanto a informação genética de origem materna quanto a de origem paterna.

RESPOSTA 19-2 Uma mulher caracteristicamente produz menos de 1.000 óvulos maduros ao longo de sua vida (12 por ano por aproximadamente 40 anos); esse número corresponde a menos de um décimo de possíveis gametas, excluindo-se os efeitos do *crossing-over* meiótico. Um homem produz bilhões de espermatozoides ao longo de sua vida, portanto, em princípio, cada possível combinação é testada várias vezes.

RESPOSTA 19-3 Por uma questão de simplificação, consideraremos uma situação onde um pai possuirá dois genes para duas características dominantes, M e N, sobre uma de suas duas cópias do cromossomo 1. Se os dois genes estão posicionados em extremidades opostas e ocorrer um e apenas um evento de recombinação por cromossomo, como postulado na questão, metade de seus filhos deverá expressar a característica M, e a outra metade deverá expressar a característica N – e nenhum dos filhos se assemelhará ao pai em termos da expressão simultânea de ambas as características. Essa situação descrita é muito diferente da realidade, onde múltiplos eventos de recombinação ocorrem em cada cromossomo, fazendo com que as características M e N sejam herdadas como se estivessem sobre cromossomos distintos. Construindo-se um diagrama de Punnett semelhante ao ilustrado na Figura 19-23, podemos observar que, considerando-se essa última situação, mais próxima da realidade, esperaríamos que um quarto dos filhos expressassem ambas as características do pai, um quarto expressasse apenas a característica M, um quarto expressasse apenas a característica N e um quarto não expressasse qualquer das características.

RESPOSTA 19-4 O endocruzamento tende a gerar indivíduos homozigotos para a maioria dos genes. Para acessar as razões desse fenômeno, considere o caso extremo em que ocorre endocruzamento pelo acasalamento entre irmão e irmã (como entre os Faraós do antigo Egito): visto que os parentais são muito próximos, existe uma alta probabilidade de que os alelos maternos e paternos herdados pelos filhos sejam idênticos. O endocruzamento continuado por várias gerações dá origem a indivíduos muito semelhantes e homozigotos em praticamente todos os lócus. Em virtude da aleatoriedade dos mecanismos de herança, existe uma grande chance de que alguns alelos deletérios se tornem prevalentes na população, conferindo uma menor capacidade adaptativa aos indivíduos. Em uma população isolada distinta, o mesmo fenômeno estará acontecendo, mas existe grande probabilidade que um outro conjunto de alelos

deletérios se torne prevalente. Quando indivíduos provenientes de duas populações endocruzadas distintas se acasalarem, a prole herdará da mãe, por exemplo, os alelos deletérios para os genes *A*, *B* e *C*, mas os alelos não deletérios dos genes correspondentes do pai. De forma complementar, a prole herdará do pai os alelos deletérios para os genes *D*, *E* e *F*, mas os alelos não deletérios dos genes correspondentes da mãe. A maioria das mutações deletérias é recessiva. Como a progênie é heterozigota para todos esses genes, escapará dos efeitos deletérios observados nos parentais.

RESPOSTA 19-5 Apesar de, em princípio, qualquer uma das três explicações poder justificar o resultado observado, A e B podem ser excluídas por serem praticamente impossíveis.

A. Não existe relato de qualquer instabilidade no DNA que seja tão grande a ponto de ser detectada em uma análise de SNPs como proposto. De qualquer forma, a hipótese pressupõe um decréscimo constante na frequência do SNP em relação à idade, e não uma queda brusca de frequência que tenha início apenas aos 50 anos de idade.
B. As alterações gênicas em populações humanas são apenas perceptíveis em longos períodos de tempo (a não ser que uma migração populacional em massa gere um influxo de indivíduos geneticamente distintos). Indivíduos nascidos há 50 anos apresentarão, em média, as mesmas características genéticas de indivíduos nascidos atualmente.
C. Essa hipótese está correta. Um SNP com essas propriedades foi usado na descoberta de um gene que parece causar um aumento substancial na probabilidade de morte por complicações cardíacas.

RESPOSTA 19-6 A seleção natural *per se* não é suficiente para eliminar genes letais recessivos de uma população. Considere a seguinte linha de raciocínio: indivíduos homozigotos recessivos defeituosos podem resultar apenas como prole de um acasalamento entre dois indivíduos heterozigotos. Pelas leis da genética mendeliana, a prole de um acasalamento entre heterozigotos apresentará uma razão de 1 homozigoto normal: 2 heterozigotos: 1 homozigoto defeituoso. Assim, estatisticamente, indivíduos heterozigotos sempre estarão em uma maior frequência do que indivíduos homozigotos para a característica defeituosa. Apesar de a seleção natural efetivamente eliminar os genes defeituosos nos indivíduos homozigotos, pela sua morte, ela é incapaz de alcançar os genes defeituosos presentes nos indivíduos heterozigotos, pois eles não afetam o fenótipo. A seleção natural manterá a frequência do gene defeituoso baixa na população, mas na ausência de qualquer outro efeito, existirá sempre um reservatório de genes defeituosos sob a forma de indivíduos heterozigotos.

Sob baixas frequências de um gene defeituoso, um outro fator pode entrar em jogo – o acaso. Variações ao acaso podem levar a um aumento ou a uma diminuição da frequência de indivíduos heterozigotos (e consequentemente da frequência do gene defeituoso). Ao acaso, a progênie de um acasalamento entre heterozigotos pode ser toda normal, o que eliminaria o gene defeituoso dessa linhagem. Um aumento na frequência de um gene defeituoso é contraposto pela seleção natural; no entanto, a diminuição não é contraposta e pode, por acaso, levar à eliminação do gene defeituoso da população. Por outro lado, novas mutações estão ocorrendo continuamente, apesar de em baixas frequências, criando novas cópias de alelos recessivos deletérios. Em uma população suficientemente grande, se estabelecerá um balanço entre a geração de novas cópias do alelo por mutação e a eliminação por morte dos homozigotos.

RESPOSTA 19-7

A. Verdadeira.
B. Verdadeira
C. Falsa. Mutações que ocorrem durante a meiose podem propagar-se, a menos que elas deem origem a gametas não viáveis.

RESPOSTA 19-8 Duas cópias do mesmo cromossomo podem ir para a mesma célula-filha se as conexões com os microtúbulos se quebrarem antes que as cromátides-irmãs tenham sido separadas. Outra possibilidade é que microtúbulos do mesmo polo do fuso se conectem a ambos os cinetocoros do cromossomo. Como consequência desse erro grave, pouco frequente, uma célula-filha conterá uma única cópia dos genes presentes naquele cromossomo, e a outra célula-filha conterá três cópias. A dose genética alterada, que leva a alterações correspondentes nas quantidades produzidas de mRNA e de proteína, é muitas vezes deletéria para a célula. Se esse tipo de erro acontece na meiose, no processo de formação dos gametas, ele será transmitido para todas as células do organismo. Por exemplo, um tipo de retardo mental denominado síndrome de Down resulta da presença de três cópias do cromossomo 21 em todas as células do organismo.

RESPOSTA 19-9 A meiose tem início com a duplicação do DNA, originando uma célula que contém quatro cópias de cada cromossomo. Essas quatro cópias devem ser distribuídas igualmente durante as duas divisões sequenciais da meiose para a formação de quatro células haploides. As cromátides-irmãs permanecem pareadas para que (1) as células resultantes da primeira divisão recebam conjuntos completos de cromossomos e (2) os cromossomos possam ser distribuídos igualmente na segunda divisão meiótica. Se as cromátides-irmãs não permanecessem pareadas, seria impossível distinguir, na segunda divisão meiótica, as cromátides equivalentes, e, portanto, seria muito difícil garantir que exatamente uma cópia de cada cromátide fosse direcionada para cada célula-filha. A manutenção das cromátides pareadas durante a primeira divisão meiótica é, portanto, uma forma fácil de realizar um acompanhamento das cromátides.

Esse princípio biológico sugere que você deve unir os pares de meias que deseja lavar antes de colocá-los na lavadora de roupas. Dessa forma, a difícil tarefa de localizar os pés-de-meia e de reorganizá-los em pares – e os inevitáveis erros que acontecem nesse processo – não será mais necessária.

RESPOSTA 19-10

A. Um gene corresponde a uma fita de DNA que codifica uma proteína ou um RNA funcional. Um alelo é uma forma alternativa de um gene. Em uma população frequentemente existem vários alelos "normais", cujas funções são indistinguíveis. Além desses, existem vários alelos raros que levam a defeitos em diferentes graus. Um indivíduo, no entanto, possuirá apenas um máximo de dois alelos de cada gene.
B. Um indivíduo é dito homozigoto se os dois alelos do gene são idênticos. Um indivíduo é dito heterozigoto se os dois alelos para o gene em questão são diferentes.
C. O genótipo é o conjunto específico de alelos que formam o genoma de um indivíduo; ele corresponde à enumeração de todas as formas específicas de cada gene no genoma. Na prática, no caso de organismos estudados em laboratório, o genótipo é comumente especificado como uma lista de diferenças conhecidas entre o indivíduo e o tipo selvagem, considerado como padrão, e que ocorre natural-

mente. O fenótipo é a descrição das características visíveis de um indivíduo. O fenótipo é geralmente uma lista de diferenças das características existentes entre o indivíduo e o tipo selvagem.

D. Um alelo *A* é dominante (em relação ao alelo *a*) se a presença, mesmo de uma única cópia de *A*, é suficiente para afetar o fenótipo, ou seja, se heterozigotos (com genótipo *Aa*) são distintos em aparência de homozigotos *aa*. Um alelo *a* é recessivo (em relação ao alelo *A*) se a presença de uma única cópia não faz diferença no fenótipo, ou seja, se indivíduos *Aa* não diferem de indivíduos *AA*. Se o fenótipo dos indivíduos heterozigotos difere de ambos os fenótipos homozigotos, os alelos são ditos codominantes.

RESPOSTA 19-11

A. Visto que as plantas de ervilha são diploides, qualquer planta pertencente a uma linhagem pura deve possuir duas cópias mutantes do mesmo gene – ambas apresentando perda de função.

B. Não, o mesmo fenótipo é frequentemente produzido por vários genótipos diferentes.

C. Se cada planta possuir uma mutação em um gene distinto, a situação poderá ser revelada por testes de complementação (ver Painel 19-1, p. 674). Quando a planta A foi cruzada com a planta B, todas as plantas da F_1 produziram apenas sementes lisas. O mesmo resultado foi obtido quando a planta B foi cruzadas com a planta C, ou quando a planta A foi cruzada com a planta C. Em contraste, um cruzamento entre quaisquer duas plantas de linhagens puras que possuem mutações de perda de função sobre o mesmo gene (mesmo que essas mutações sejam distintas) levará à produção unicamente de plantas com sementes rugosas.

RESPOSTA 19-12

A. É provável que a mutação seja dominante, pois aproximadamente metade da progênie nascida de um parental afetado – em cada um dos três casamentos com parceiros saudáveis – apresenta surdez, e é pouco provável que todos esses parceiros saudáveis sejam portadores heterozigotos da mutação.

B. A mutação está presente em um autossomo. Se a mutação estivesse em um cromossomo sexual, apenas a progênie do sexo feminino poderia ser afetada (considerando-se que a mutação se originou em um gene do cromossomo X do avô), ou apenas a progênie do sexo masculino seria afetada (considerando-se que a mutação se originou em um gene do cromossomo Y do avô). De fato, o heredograma revela que tanto alguns homens quanto algumas mulheres herdaram a forma mutante do gene.

C. Suponha que a mutação estivesse presente em uma das duas cópias do cromossomo 12 do avô. Cada uma dessas cópias do cromossomo 12 deve apresentar diferentes padrões de SNPs, visto que foram herdadas respectivamente de seu pai e de sua mãe. Cada uma das cópias do cromossomo 12 que foi passada para os netos atravessou duas meioses – uma meiose a cada geração.

Visto que dois ou três eventos de *crossing-over* ocorrem por cromossomo durante uma meiose, cada cromossomo herdado por um neto foi submetido a aproximadamente cinco recombinações desde seu avô, o que o dividiu em seis segmentos. Um padrão idêntico de SNPs deve existir na vizinhança do gene, seja ele qual for, responsável pela surdez, em cada um dos quatro netos afetados; além disso, esse padrão de SNPs deve ser claramente distinto do padrão que existe na vizinhança do mesmo gene em cada um dos sete netos normais para a característica em questão. Esses SNPs formam um bloco de haplótipo excepcionalmente grande – que se estende por um sexto do comprimento do cromossomo 12. (Um quarto do DNA de cada neto terá sido herdado do avô, correspondendo a aproximadamente 70 segmentos desse comprimento espalhados ao longo dos 46 cromossomos presentes nos netos.)

RESPOSTA 19-13 O indivíduo 1 pode ser tanto heterozigoto (+/-) quanto homozigoto para o alelo normal (+/+). (Ambos os parentais devem ser heterozigotos, pois tiveram uma criança homozigota mutante.) O indivíduo 2 deve ser homozigoto para o alelo recessivo da surdez (-/-). O indivíduo 3 é, quase com certeza, heterozigoto (+/-) e responsável pela transmissão do alelo mutante para seus filhos e netos. Visto que o alelo mutante é raro, o indivíduo 4 provavelmente é homozigoto para o alelo normal (+/+).

RESPOSTA 19-14 Seu amigo está errado. (A) As leis de Mendel, e a compreensão exata que atualmente temos em relação aos mecanismos que as condicionam, eliminaram muitas falsas concepções relativas à hereditariedade humana. Uma delas referia que o primogênito possuía chances distintas dos demais filhos de herdar determinadas características de seus parentais. (B) A probabilidade de ocorrência ao acaso de um tal heredograma é de um quarto por geração, ou seja de um em 64 nas três gerações ilustradas. (C) Dados referentes a uma amostragem maior de membros da família, ou de outras gerações, rapidamente nos revelariam que o padrão regular observado nesse heredograma em especial surgiu ao acaso. (D) Um resultado oposto, se ele tivesse forte significância estatística, sugeriria que algum processo de seleção estivesse envolvido: por exemplo, parentais que tivessem um primogênito afetado podem optar mais frequentemente por uma triagem genética nas gestações subsequentes e, onde a prática é legalizada, optar pela interrupção seletiva das gestações em que se observou que o feto era afetado. Em consequência, menos fetos afetados ocorreriam nos indivíduos não primogênitos.

RESPOSTA 19-15 Cada portador é um heterozigoto, e 50% de seus espermatozoides ou óvulos possuirão o alelo ruim. Portanto, quando dois portadores se casam, existe uma chance de 25% de que um bebê herde o alelo ruim de ambos os parentais e apresente o fenótipo fatal. Visto que uma em cada 100 pessoas é portadora, um casal em cada 10.000 (100 x 100) será um casal de portadores (assumindo uma aleatoriedade na formação dos casais). Outras situações sendo iguais, um em cada 40.000 bebês nascerá com o defeito, o que corresponde a 25 bebês em um total de um milhão de nascimentos.

RESPOSTA 19-16 Uma mutação dominante-negativa resulta em um produto gênico mutante que interfere na função de um produto gênico normal, causando um fenótipo de perda de função, mesmo na presença de uma cópia normal do gene. A capacidade de um único alelo defeituoso em determinar o fenótipo é a razão pela qual ele é denominado dominante. Uma mutação de ganho de função aumenta a atividade de um gene ou o torna ativo em circunstâncias inadequadas. A alteração na atividade frequentemente apresenta consequências fenotípicas, razão pela qual essas mutações são em geral dominantes.

RESPOSTA 19-17 Essa afirmação é, em geral, verdadeira. O diabete é uma das primeiras doenças a ter sido descrita pelos seres humanos, sua descrição datando da época da Grécia antiga. O próprio nome da doença vem da palavra grega

para sifão, a qual era usada para descrever um dos principais sintomas: "A doença foi denominada diabete, pois seu comportamento era o de um sifão, convertendo o corpo humano em uma pipa para o transvase de humores líquidos" (em outras palavras, pacientes não tratados têm sede constante, que é contrabalançada pelo excesso de urina). Se não existisse doença, o papel da insulina poderia ter passado despercebido por um longo tempo. É verdade que, em um dado momento, teríamos compreendido sua função – e hoje provavelmente já a saberíamos. De qualquer forma, é inquestionável o papel das doenças no direcionamento de nossos esforços rumo à compreensão molecular. Ainda hoje, a busca de soluções voltadas para a cura de doenças humanas é a principal força direcionadora da pesquisa biomédica.

RESPOSTA 19-18

A. Como salientado na **Figura R19-18**, se moscas defeituosas em diferentes genes forem acasaladas, sua progênie possuirá um gene normal em cada lócus. No caso de um acasalamento entre uma mosca de olhos rubi e uma mosca de olhos brancos, cada indivíduo da progênie herdará uma cópia funcional do gene branco de um dos parentais e uma cópia normal do gene rubi do outro parental. Visto que cada um dos alelos mutantes é recessivo em relação a seu alelo selvagem correspondente, a progênie apresentará um fenótipo tipo selvagem – olhos vermelho-tijolo.

B. *Garnet*, rubi, *vermilion* e *carnation se* complementam mutuamente e aos vários alelos do gene branco (ou seja, quando essas moscas mutantes são acasaladas entre elas, produzem moscas com coloração normal dos olhos). Assim, cada uma dessas mutações se encontra em um gene distinto. Em contraste, branco, cereja, coral, *apricot* e *buff* não são complementares; assim, elas devem representar alelos do mesmo gene, o qual foi denominado *white* (branco). Em conclusão, esses nove diferentes mutantes de cor de olhos definem cinco genes distintos.

C. Diferentes alelos do mesmo gene, assim como os cinco alelos do gene *white*, frequentemente resultam em fenótipos distintos. Diferentes mutações comprometem a função de um produto gênico sob formas distintas, dependendo do local da mutação. Alelos que não produzem qualquer molécula funcional (alelos nulos), mesmo que sejam resultantes de alterações em diferentes sequências do DNA, levam ao mesmo fenótipo.

RESPOSTA 19-19 SNPs são diferenças em um único nucleotídeo entre indivíduos, para as quais duas ou mais variantes são encontradas em alta frequência na população. Na população humana, os SNPs ocorrem no genoma em uma frequência de aproximadamente um a cada 1.000 nucleotídeos. Muitos SNPs foram identificados e mapeados em diferentes organismos, incluindo vários milhões no genoma humano. SNPs, que podem ser detectados por hibridização com oligonucleotídeos, podem ser utilizados como marcadores físicos cuja posição no genoma seja conhecida. A busca de um gene mutante pode ser feita pelo acompanhamento de acasalamentos e correlação da presença do gene com a herança simultânea de variantes específicas de SNPs, resultando na delimitação mais fina da sua potencial localização em uma região cromossômica que contenha apenas alguns poucos genes. Esses genes candidatos podem então ser testados em relação à presença de uma mutação que possa responder pelo fenótipo mutante original (ver Figura 19-32).

RESPOSTA 19-20 O que você sabe de imediato são todas as diferenças entre as sequências nucleotídicas entre Tim e John. No entanto, variantes raras na população humana não são úteis para a maior parte das análises de mapeamento genético. A análise de cada variante em relação à sua frequência, em uma

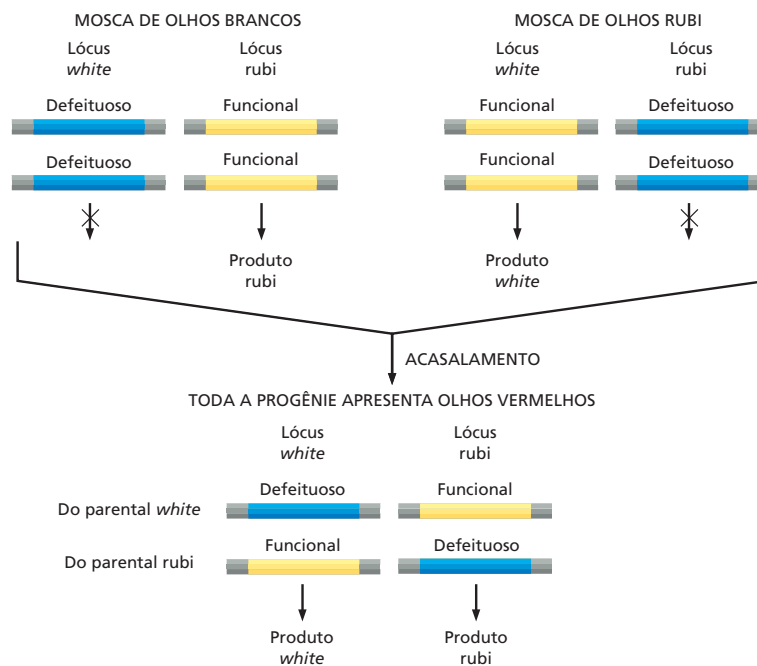



Figura R19-18

grande população, revelará quais das variantes são encontradas em pelo menos 10% dos indivíduos da população. Serão esses os SNPs que fornecerão dados úteis como marcadores em análises de mapeamento futuras.

CAPÍTULO 20

RESPOSTA 20-1 A orientação horizontal dos microtúbulos está associada à orientação horizontal das microfibrilas de celulose depositada na parede celular. O crescimento das células será, portanto, na direção vertical, expandindo a distância entre as microfibrilas de celulose sem espichar essas fibras. Dessa forma, o tronco irá alongar rapidamente. No ambiente natural típico, isso vai acelerar a emergência do escuro para o claro.

RESPOSTA 20-2

A. Como as três cadeias de colágenos devem unir-se para formar a tripla-hélice, um defeito na molécula irá impedir a união, mesmo que uma cadeia normal de colágeno esteja presente. As mutações no colágeno são dominantes, isto é, elas têm um efeito deletério mesmo na presença de uma cópia normal do gene.
B. As diferenças da severidade das mutações resultam da polaridade do processo de reunião. Os monômeros de colágeno se reúnem em um bastão de tripla-hélice a partir de sua porção aminoterminal. Uma mutação nas primeiras glicinas permite a formação de bastões curtos, e mutações em outros aminoácidos localizados mais adiante no gene permitem a formação de bastões mais longos e normais.

RESPOSTA 20-3 A capacidade marcante de inchar e ocupar um grande volume depende das cargas negativas. Essas atraem uma nuvem de íons positivos, comandada por Na^+, o qual, por osmose, absorve uma grande quantidade de água, fornecendo aos proteoglicanos suas propriedades típicas. Polissacarídeos não carregados, como a celulose, o amido e o glicogênio, por outro lado, são facilmente compactados em fibras ou grânulos.

RESPOSTA 20-4 Os locais de contato focal são comuns no tecido conectivo, onde os fibroblastos exercem forças de tração na matriz extracelular, e, nas culturas de células, observa-se o rastejamento das células. As forças que empurram a matriz ou que dirigem os movimentos rastejantes são geradas pelos filamentos de actina do citoesqueleto. No epitélio maduro, os locais de contato focal são menos proeminentes, porque as células são fixas e não necessitam rastejar sobre a lâmina basal nem empurrá-la.

RESPOSTA 20-5 Suponha que uma célula esteja danificada de modo que sua membrana plasmática vaze. Os íons presentes em altas concentrações no líquido extracelular, como Na^+ e Ca^{2+}, entram rapidamente nas células e os valiosos metabólitos vazam. Se a célula permanecer conectada às suas vizinhas saudáveis, essas também irão sofrer dano. No entanto, o influxo de Ca^{2+} na célula alterada faz com que sua junção tipo fenda feche imediatamente, isolando a célula e impedindo que o dano se espalhe.

RESPOSTA 20-6 A radiação ionizante (de alta energia) atravessa a matéria, expulsando elétrons de suas órbitas e quebrando as ligações químicas. Ela cria quebras e outros danos no DNA, fazendo com que a célula interrompa o ciclo celular (ver Capítulo 18). Se o dano for tão severo que não pode ser reparado, a célula se torna permanentemente em repouso e sofre apoptose, isto é, ela ativa o programa suicida.

RESPOSTA 20-7 As células do epitélio do intestino estão expostas a um ambiente muito hostil contendo enzimas digestórias e outras substâncias que variam drasticamente de um dia para outro dependendo da alimentação. As células epiteliais também formam a primeira linha de defesa contra componentes potencialmente danosos e mutagênicos que são únicos no nosso ambiente. A renovação rápida protege o organismo das consequências danosas, quando as células danificadas ou doentes são eliminadas. Se uma célula epitelial começa a dividir de forma inadequada, como resultado de mutação, por exemplo, ela e sua progênie indesejável serão descartadas naturalmente no ápice dos vilis. Mesmo que essas mutações ocorram com frequência, elas raramente dão origem ao câncer.

Por outro lado, um neurônio vive em um ambiente extremamente protegido, isolado do ambiente externo. Sua função depende de um sistema complexo de conexões com outros neurônios, um sistema que é criado durante o desenvolvimento e não é fácil de reconstruí-lo se um neurônio morrer subsequentemente.

RESPOSTA 20-8 Cada divisão celular gera uma célula adicional. Assim, se a célula nunca for perdida nem descartada do organismo, o número de células no corpo deve ser igual ao numero de divisões mais uma. O número de divisão é 1.000 vezes maior do que o número de células, porque, durante a vida, 1.000 células foram descartadas e substituídas para cada célula que é retida no organismo.

RESPOSTA 20-9

A. Falso. As junções tipo fenda não são conectadas ao citoesqueleto. Seu papel é proporcionar uma comunicação célula-célula permitindo que pequenas moléculas passem de uma célula à outra.
B. Verdadeiro. Murchando, a pressão de turgor da célula vegetal é reduzida, e, consequentemente, a parede celular, tendo elasticidade, mas pouca força de compressão, como um pneu, não fornece mais rigidez.
C. Falso. Os proteoglicanos podem suportar grande força de compressão, mas não possuem uma estrutura rígida. Sua propriedade de preenchimento de espaço resulta de sua tendência de absorver grandes quantidades de água.
D. Verdadeiro.
E. Verdadeiro.
F. Verdadeiro. As células-tronco expressam estavelmente genes de controle que asseguram que suas células-filhas sejam do tipo celular diferenciado adequado.

RESPOSTA 20-10 Pequenas moléculas citosólicas, como o ácido glutâmico, o AMP cíclico e íons Ca^{2+}, passam facilmente pelas junções tipo fenda e plasmodesmata, ao passo que grandes macromoléculas citosólicas, como o mRNA e as proteínas G, são excluídas. Os fosfolipídeos da membrana plasmática difundem no plano da membrana pelos plasmodesmata, porque as membranas plasmáticas das células adjacentes são contínuas através dessas junções. Esse tráfego não é possível pelas junções tipo fenda, porque as membranas das células conectadas permanecem separadas.

RESPOSTA 20-11 As plantas são expostas a mudanças extremas no ambiente, as quais são acompanhadas por grandes flutuações nas propriedades osmóticas da sua vizinhança. Uma

rede de filamentos intermediários, como conhecemos das células animais, não seria capaz de fornecer suporte osmótico completo para a célula. Os pontos de ligação esparsos semelhantes a botões de pressão não seriam capazes de impedir o rompimento da membrana em resposta à grande pressão osmótica aplicada no interior da célula.

RESPOSTA 20-12 As ações potenciais podem passar de célula à célula pelas junções tipo fenda. As células musculares cardíacas são conectadas dessa forma, assegurando que elas contraiam sincronicamente quando estimuladas. Entretanto, esse mecanismo de passar os sinais de uma célula à outra é limitado. Como discutimos no Capítulo 12, as sinapses são muito mais sofisticadas e permitem que sinais sejam modulados e integrados com outros sinais recebidos pela célula. Assim, as junções tipo fenda são simples ligações entre componentes elétricos, e as sinapses são dispositivos interruptores complexos, permitindo que o sistema de neurônios realizem cálculos.

RESPOSTA 20-13 Para fazer gelatina, ela é fervida em água, a qual desnatura as fibras de colágeno. Com o resfriamento, as fibras desordenadas de uma massaroca solidificam em um gel. Esse gel se assemelha ao colágeno, quando é inicialmente secretado pelos fibroblastos, isto é, antes de se alinharem e fazerem as ligações cruzadas.

RESPOSTA 20-14 A evidência de que o DNA é o projeto que especifica todas as características estruturais de um organismo se baseia na observação de que pequenas mudanças no DNA por mutações resultam em mudanças no organismo. Embora o DNA forneça o plano que especifica a estrutura, esses planos necessitam ser executados durante o desenvolvimento. Isso requer um ambiente apropriado (um bebê humano não encaixaria na casca de um ovo de cegonha), nutrição adequada e ferramentas corretas (como os reguladores transcricionais necessários para o início do desenvolvimento), organização espacial apropriada (como as assimetrias no ovo requerem diferenciação celular adequada durante as primeiras divisões celulares), e assim por diante. Assim, a herança não é restrita à passagem do DNA de um organismo para o outro, porque o desenvolvimento requer que condições apropriadas sejam fornecidas pelos pais. Apesar de tudo, quando todas essas condições são satisfeitas, o plano arquivado no genoma irá determinar a estrutura do organismo que será construído.

RESPOSTA 20-15 Os neutrófilos circulam na corrente sanguínea e migram para dentro e para fora dos tecidos realizando sua função normal de proteger o organismo contra infecções. Elas são naturalmente invasivas. Uma vez que ocorra uma mutação que altere o controle normal da produção dessas células, não há necessidade para mutações adicionais para que essas células se espalhem pelo corpo. Assim, o numero de mutações que devem acumular para dar origem à leucemia é menor do que para outros tipos de câncer.

RESPOSTA 20-16 A forma da curva reflete a necessidade do acúmulo de múltiplas mutações em uma célula antes de ocorrer o câncer. Se uma única mutação fosse suficiente, o gráfico teria uma linha reta horizontal. A probabilidade da ocorrência de uma determinada mutação e, portanto, câncer deveria ser a mesma em qualquer idade. Se duas mutações específicas fossem necessárias, o gráfico seria uma linha reta subindo logo na origem, a segunda mutação teria a mesma probabilidade de ocorrer em qualquer momento, mas irá tornar-se célula cancerosa somente se já tiver ocorrido uma mutação na mesma linhagem, e a probabilidade de que essa primeira mutação ocorra será proporcional à idade do indivíduo. A curva abrupta mostrada no gráfico sobe aproximadamente na quinta década, o que indica que mais de duas mutações foram necessárias antes do início do câncer. Não é fácil dizer precisamente quantas, em virtude das formas complexas do desenvolvimento do câncer. Mutações sucessivas podem alterar o número e o comportamento celular e, portanto, alterar a probabilidade de mutações subsequentes e das pressões seletivas que direcionam a evolução do câncer.

RESPOSTA 20-17 Mutações são induzidas durante a exposição a um carcinógeno, mas o número de mutações relevantes em uma célula em geral não é suficiente para converter diretamente essas células em câncer. Ao longo dos anos, a célula se torna predisposta ao câncer pelo acúmulo de mutações induzidas de forma progressiva. Eventualmente, uma delas irá se tornar uma célula cancerosa. O longo período entre a exposição e o câncer torna muito difícil acusar legalmente os produtores de cigarro ou de carcinógenos industriais pelos danos causados por seus produtos.

RESPOSTA 20-18 Por definição, um carcinógeno é uma substância que promove a ocorrência de um ou mais tipos de câncer. Os hormônios sexuais podem, portanto, ser classificados como carcinógenos naturais. Embora as maiorias dos carcinógenos atuem diretamente causando mutações, os seus efeitos são exercidos de outra forma. Os hormônios sexuais aumentam a taxa de divisão celular e o número de células em órgãos sensíveis ao hormônio, como a mama, o útero e a próstata. O primeiro efeito aumenta a taxa de mutações por célula, porque as mutações, independentemente dos fatores ambientais, são geradas espontaneamente durante a replicação do DNA e a segregação dos cromossomos. O segundo efeito aumenta o número de células sem risco. Dessa e possivelmente de outras maneiras, os hormônios podem favorecer o desenvolvimento de câncer, mesmo que não causem mutação diretamente.

RESPOSTA 20-19 A resposta mais rápida é não. O câncer em geral não é uma doença hereditária. Ele surge de novas mutações que ocorrem nas células somáticas, em vez de mutações que herdamos de nossos pais. Raros tipos de câncer apresentam um fator de risco hereditário, de modo que os pais e seus filhos apresentam a mesma pré-disposição a uma determinada forma da doença. Isso ocorre, por exemplo, em famílias portadoras de uma mutação que elimina uma das duas cópias do gene supressor de tumor *APC*, a criança então herda uma propensão ao câncer colorretal. Tendências hereditárias mais amenas são observadas em outros tipos de câncer, incluindo o câncer de mama, mas os genes responsáveis por esses efeitos são, ainda, em sua maioria, desconhecidos.

Glossário

acetil-CoA (acetil coenzima A)
Molécula pequena hidrossolúvel que carrega os grupos acetila nas células. Contém um grupo acetila ligado à coenzima A (CoA) por uma ligação tioéster facilmente hidrolisada.

ácido
No contexto da biologia celular, molécula orgânica que se dissocia em água para gerar íons de hidrônio (H_3O^+) (produzindo, assim, um baixo pH).

ácido desoxirribonucleico – *ver* DNA

ácido nucleico
RNA ou DNA; consiste em uma cadeia de nucleotídeos unidos por ligações fosfodiéster.

ácido ribonucleico – *ver* RNA

ácidos graxos
Composto, como o ácido palmítico, que tem um ácido carboxílico ligado a uma longa cadeia de hidrocarbonetos. Usado como a principal fonte de energia durante o metabolismo e como um ponto de partida para a síntese de fosfolipídeos. (*Ver* Painel 2-4, p. 70-71.)

acoplamento quimiosmótico
Mecanismo em que um gradiente de íons hidrogênio (gradiente de pH), através de uma membrana, é usado para promover um processo que requer energia, como a produção de ATP ou o transporte de uma molécula através de uma membrana.

açúcar
Uma substância feita de carbono, hidrogênio e oxigênio com fórmula geral $(CH_2O)n$. Um carboidrato ou sacarídeo. O "açúcar" de uso diário é a sacarose, um dissacarídeo de sabor doce específico produzido por beterraba ou cana-de-açúcar.

adaptação
Ajuste da sensibilidade de uma célula ou um organismo após estimulação repetida. Permite uma resposta, mesmo na presença de um alto nível de estimulação.

adenilato-ciclase
Enzima que catalisa a formação de AMP cíclico a partir do ATP. Um componente importante de algumas vias de sinalização intracelular.

ADP (5'– difosfato de adenosina)
Nucleotídeo produzido pela hidrólise de fosfato terminal do ATP. (*Ver* Figura 3-31.)

alça de retroalimentação positiva
Situação em que o produto final de uma reação estimula a sua própria produção.

álcool
Composto orgânico que contém um grupo hidroxila (– OH) ligado a um átomo de carbono saturado – álcool etílico, por exemplo. (*Ver* Painel 2-1, p. 64-65.)

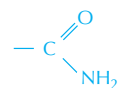
aldeído
Composto orgânico reativo que contém o grupo HC=O, por exemplo gliceraldeído. (*Ver* Painel 2-1, p. 64-65.)

alelo
Uma de uma série de formas alternativas de um gene. Em uma célula diploide, cada gene terá dois alelos, cada um ocupando a mesma posição (lócus) em cromossomos homólogos.

α-hélice – *ver* alfa-hélice

alfa-hélice (α-hélice)
Motivo estrutural comum das proteínas onde uma sequência linear de aminoácidos se dobra em uma hélice torcida para a direita, estabilizada por pontes de hidrogênio internas entre os átomos da cadeia principal.

alostérico
Descreve uma proteína que se apresenta em duas ou mais conformações, dependendo da ligação de uma molécula (um ligante) em um outro sítio que não o sítio catalítico. Proteínas alostéricas são compostas de múltiplas subunidades, muitas vezes mostram uma resposta cooperativa à ligação do ligante, pois a ligação do ligante a uma subunidade facilita a ligação de ligantes a outras subunidades.

amida
Molécula que contém um grupo carbonila ligado a uma amina. (*Ver* Painel 2-1, p. 64-65.)
amido
Polissacarídeo composto exclusivamente de unidades de glicose, utilizado como fonte de energia nas células vegetais.

amina
Molécula que contém um grupo amino (– NH_2). (*Ver* Painel 2-1, p. 64-65.)

aminoácido
Molécula orgânica que contém um grupo amino e um grupo carboxila. Os α-aminoácidos (aqueles em que os grupos amino e carboxila estão ligados a um mesmo átomo de carbono) servem como blocos de construção das proteínas. (Ver Painel 2-5, p. 72-73.)

aminoacil-tRNA-sintetase
Enzima que liga o aminoácido correto a uma molécula de tRNA para formar um aminoacil-tRNA.

AMP (5′-monofosfato de adenosina)
Um dos quatro nucleotídeos em uma molécula de RNA. O AMP é produzido pela hidrólise energeticamente favorável do ATP. *(Ver* Figura 3-40.)

AMP cíclico (cAMP)
Nucleotídeo gerado a partir do ATP em resposta à estimulação hormonal dos receptores de superfície celular. O cAMP age como uma molécula sinalizadora pela ativação da proteína-cinase A; ele é hidrolisada a AMP pela fosfodiesterase.

anabolismo
Vias de reações pelas quais moléculas grandes são feitas a partir de moléculas menores. Biossíntese.

anaeróbio
Descreve uma célula, organismo ou processo metabólico que ocorre na ausência de ar ou, mais precisamente, na ausência de oxigênio molecular.

anáfase
Estágio da mitose durante o qual os dois grupos de cromossomos se separam e se distanciam um do outro. Composta da anáfase A (onde os cromossomos se movem em direção aos polos do fuso) e da anáfase B (onde os polos do fuso se distanciam).

anel γ-tubulina
Complexo proteico no centrossomo que centraliza a montagem dos microtúbulos.

anfipática
Que tem regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, como uma molécula de fosfolipídeo ou de um detergente.

ânion
Íon carregado negativamente, como Cl^- ou CH_3COO^-.

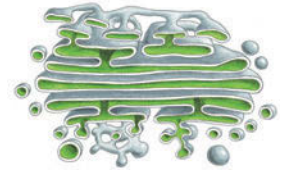
anticódon
Sequência de três nucleotídeos em uma molécula de RNA transportador, complementar ao códon de três nucleotídeos em uma molécula de RNA mensageiro; cada anticódon se combina a um aminoácido específico ligado covalentemente a uma molécula de RNA transportador.

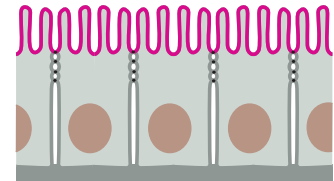
anticorpo
Proteína produzida pelos linfócitos B em resposta a uma molécula estranha ou organismo invasor. Liga-se fortemente à molécula ou célula estranha, inativando-a ou marcando-a para a destruição.

antígeno
Molécula que provoca a produção celular de anticorpos específicos em uma resposta imune.

antiparalelo
Descreve duas estruturas similares arranjadas em orientações opostas, como duas fitas de um DNA de dupla-hélice.

antiporte
Tipo de transportador acoplado que transporta dois íons diferentes ou moléculas pequenas através de uma membrana em direções opostas, simultaneamente ou em sequência.

aparelho de Golgi
Organela envolta por membrana em células eucarióticas onde as proteínas e os lipídeos sintetizados no retículo endoplasmático são modificados e classificados para transporte para outros locais. (Nome dado em virtude do seu descobridor, Camillo Golgi.)

APC – *ver* complexo promotor de anáfase

apical
Descreve o topo de uma célula, estrutura ou órgão. A superfície apical de uma célula epitelial é exposta à superfície livre (oposta à superfície basal).

apolar
Descrição de uma molécula que não possui um acúmulo local de carga positiva ou negativa. Moléculas apolares são geralmente insolúveis em água.

apoptose
Tipo normal, benigno de morte celular programada na qual a célula encolhe, fragmenta seu DNA e altera sua superfície para ativar a fagocitose da célula pelos macrófagos.

Archaea
Uma das duas divisões de procariotos, tipicamente encontrada em ambientes hostis, como fontes de águas termais ou com alta salinidade. *(Ver também* Bacteria.)

árvore filogenética
Fluxograma ou "árvore da família" que mostra a história evolutiva de um grupo de organismos.

áster
Sistema, em forma de estrela, de microtúbulos que emanam a partir do centrossomo ou do polo do fuso mitótico.

ativador
É uma proteína que se liga a uma região reguladora específica do DNA para permitir a transcrição de um gene adjacente.

átomo
A menor partícula de um elemento que ainda mantém suas propriedades químicas distintas.

ATP (5′-trifosfato de adenosina)
Trifostato de nucleosídeo trifosfato composto de adenina, ribose e três grupos fosfato; principal carreador de energia química nas células. Os grupos fosfatos terminais são altamente reativos, no sentido de que sua hidrólise, ou transferência para outra molécula, é acompanhada pela liberação de uma grande quantidade de energia livre. *(Ver* Figuras 2-23, 3-31.)

ATP-sintase
Complexo enzimático associado à membrana que catalisa a formação de ATP durante a fosforilação oxidativa e a fotossíntese. Encontrada na mitocôndria, no cloroplasto e na bactéria.

atração eletrostática
Força atrativa que ocorre entre átomos de cargas opostas. Exemplos são as ligações iônicas e as atrações entre moléculas contendo ligações covalentes polares.

autocorreção
O processo pelo qual a DNA-polimerase corrige seus próprios erros enquanto ela se move ao longo do DNA.

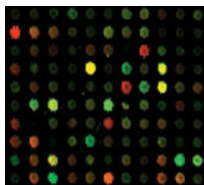
axônio
Processo fino e longo da célula nervosa capaz de conduzir rapidamente impulsos nervosos por longas distâncias, bem como transmitir sinais para outras células.

Bacteria
Nome comum para organismos procarióticos, mas mais precisamente se refere às eubactérias, "bactérias verdadeiras", um dos três principais domínios da vida. A maioria são organismos unicelulares. Algumas espécies de bactérias causam doenças. *(Ver também* Archaea.)

bacteriorrodopsina
Proteína pigmentada encontrada na membrana plasmática da bactéria halofílica *Halobacterium halobium;* bombeia prótons para fora da célula em resposta à luz.

basal
Situado próximo à base. A superfície basal de uma célula é oposta à superfície apical.

base
Molécula que aceita um próton em solução. Também usado para se referir à purina ou pirimidina no DNA ou RNA, que são bases orgânicas.

biblioteca de DNA
Coleção de moléculas de DNA clonadas, representando um genoma inteiro (biblioteca genômica) ou cópias dos mRNAs produzidos por uma célula (biblioteca de cDNA).

bicamada lipídica
Lâmina fina bimolecular de moléculas de fosfolipídeos, que formam, principalmente, a base da estrutura de todas as membranas celulares. As duas camadas de moléculas de lipídeos estão dispostas com suas caudas hidrofóbicas direcionadas para dentro da membrana e sua cabeça hidrofílica para fora, exposta para a água.

biorientação
O alinhamento simétrico dos pares de cromátides-irmãs no fuso mitótico, de modo que uma cromátide está ligada a um polo do fuso, e a outra cromátide, ao polo oposto.

biossíntese
A formação de moléculas complexas a partir de substâncias simples por células vivas.

bivalente
Um cromossomo duplicado pareado com seu cromossomo homólogo duplicado no início da meiose.

bloco haplótipo
Uma combinação de alelos e outros marcadores de DNA em um cromossomo que foi herdado em um grande bloco ligado – não perturbado por recombinação genética – através de muitas gerações.

bomba de Na^+–K^+ (Na^+–K^+ ATPase, bomba de sódio)
Proteína carreadora transmembrana, encontrada na membrana plasmática da maioria das células animais, que bombeia Na^+ para fora e K^+ para dentro das células, usando a energia derivada da hidrólise do ATP.

bomba de sódio – *ver* bomba Na^+-K^+

C-terminal (carboxiterminal)
O final de uma cadeia polipeptídica que carrega um grupo de ácido carboxílico não ligado.

cadeia de transporte de elétrons
Uma série de moléculas carreadoras de elétrons embebida na membrana, ao longo das quais os elétrons se movem a partir de um nível mais alto de energia para um mais baixo, como na fosforilação oxidativa e na fotossíntese.

cadeia lateral
Porção de um aminoácido que não está envolvida nas ligações peptídicas; a cadeia lateral dá a cada aminoácido propriedades únicas.

caderina
Um membro de uma família de proteínas que serve de mediador na adesão célula-célula dependente de Ca^{+2} nos tecidos animais.

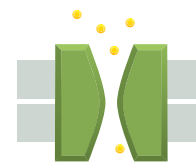
calmodulina (CaM)
Proteína pequena ligada em Ca^{+2} que modifica a atividade de muitas enzimas-alvo e proteínas de transporte em membrana em resposta à alteração na concentração de Ca^+.

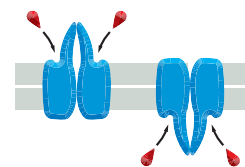
caloria
Unidade de calor. Uma caloria ("c") é a quantidade de calor necessária para aumentar a temperatura de 1 grama de água em 1°C.

CaM – *ver* calmodulina

camada de carboidrato
Uma camada de resíduos de açúcar, incluindo as porções de polissacarídeos dos proteoglicanos e oligossacarídeos ligados a moléculas de proteínas ou lipídeos, sobre a superfície externa de uma célula.

camundongo nocaute
Camundongo modificado geneticamente em que um gene específico foi inativado, por exemplo, por introduzir uma deleção no seu DNA.

canal
Um poro aquoso em uma membrana lipídica, com paredes feitas de proteína, através do qual moléculas e íons selecionados podem passar.

canal controlado por *estresse*
Proteína de membrana que permite a entrada seletiva de íons específicos para dentro de uma célula e é aberta pela força mecânica.

canal controlado por ligante
Um canal de íons que abre quando se liga a pequenas moléculas, como um neurotransmissor.

canal controlado por voltagem
Proteína de membrana que permite seletivamente que íons como Na^+ (canal de Na^+ controlado por voltagem) atravessem uma membrana; a proteína é aberta por mudanças no potencial de membrana. É encontrado principalmente em células excitáveis eletricamente, como no músculo e no nervo.

canal iônico
Proteína transmembrana ou complexo proteico que forma um canal preenchido de água através da bicamada lipídica, onde íons inorgânicos específicos podem se difundir de acordo com seu gradiente eletroquímico.

câncer
Doença causada pela divisão celular anormal ou descontrolada, resultando em crescimento localizado, ou tumores, que pode espalhar-se pelo corpo.

carboidrato
Termo geral para açúcares e compostos relacionados à fórmula geral $(CH_2O)n$. (ver Painel 2-3, p. 68-69.)

carboxiterminal – *ver* C-terminal

cariótipo
Todo o conjunto de cromossomos de uma célula arranjados com relação ao tamanho, à forma e ao número.

carreador ativado
Uma molécula pequena usada para carrear energia ou grupos químicos em diferentes reações metabólicas. Exemplos incluem ATP, acetil-CoA e NADH.

carreador de elétron
Molécula, como o citocromo *c,* que transfere um elétron de uma molécula doadora para uma molécula receptora.

cascata – *ver* cascata de sinalização

cascata de sinalização
Sequência de reações proteicas ligadas, muitas vezes incluindo fosforilação e defosforilação, que carrega informações dentro da célula, muitas vezes amplificando um sinal inicial.

caspase
Uma família de proteases. Membros da família são ativados como parte da via que leva à apoptose.

catabolismo
Termo geral para reações catalisadas por enzimas em uma célula pela qual moléculas complexas são degradadas a moléculas simples com liberação de energia. Intermediários nessas reações catabólicas são algumas vezes chamados de catabólitos.

catalisador
Substância que acelera uma reação química sem sofrer alterações. Enzimas são proteínas catalisadoras.

catálise
A aceleração de uma reação química pela presença de uma substância (o catalisador) que permanece não alterada após a reação. Nas células, praticamente todas as reações bioquímicas são catalisadas (por enzimas) para permitir que ocorram nas temperaturas da matéria viva e dentro do tempo necessário.

cátion
Íons carregado positivamente, como Na^+ ou $CH_3NH_3^+$.

Cdk, *ver* cinase dependente de ciclina

cDNA – *ver* DNA complementar

célula
Unidade básica da qual os organismos vivos são feitos, consistindo em uma solução aquosa de moléculas orgânicas envolvidas por uma membrana. Todas as células se originam de células preexistentes, geralmente por um processo de divisão.

célula ES – *ver* célula-tronco embrionária

célula fagocítica
Célula, como macrófagos ou neutrófilos, que é especializada em captar partículas ou microrganismos pela fagocitose.

célula germinativa (gameta)
Tipo de célula em um organismo diploide que carrega apenas um conjunto de cromossomos e é essencial para a reprodução sexual. Um espermatozoide ou um óvulo.

célula nervosa – *ver* neurônio

célula somática
Qualquer célula de planta ou vegetal que não uma célula germinativa ou precursora de linhagem germinativa. (Do grego *soma,* corpo.)

célula-tronco
Célula relativamente indiferenciada que pode continuar a se dividir indefinidamente, produzindo células-filhas que sofrem diferenciação terminal em determinados tipos de células.

célula-tronco embrionária (células ES)
Um tipo celular indiferenciado derivado da massa celular interna de um embrião mamífero jovem. As células-tronco embrionárias podem ser mantidas indefinidamente como uma população de células em proliferação (linhagem celular) em cultura, mas mantêm a capacidade de diferenciação, quando colocada em um ambiente apropriado, para gerar qualquer tipo de célula especializada no corpo adulto.

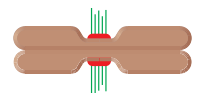
células-tronco pluripotentes induzidas (células iPS)
Célula somática reprogramada para um estado semelhante à célula-tronco embrionária pela introdução artificial de um determinado conjunto de genes.

celulose
Polissacarídeo estrutural que consiste em longas cadeias de unidades de glicose ligadas covalentemente. Ele promove a força tensora na parede de células vegetais.

centríolo
Pequeno arranjo cilíndrico de microtúbulos, geralmente encontrado em pares no centro de um centrossomo nas células animais. Também encontrado na base dos cílios e flagelos (e chamado de corpo basal).

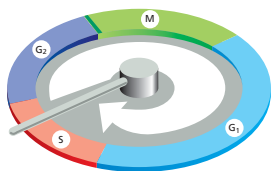
centro de reação
Nas membranas fotossintéticas, um complexo proteico que contém um par especializado de moléculas de clorofila que fazem as reações fotoquímicas para converter a energia dos fótons (luz) em elétrons de alta energia para o transporte pela cadeia fotossintética transportadora de elétrons.

centro ferro-enxofre
Membro de uma família de transportadores de elétrons que contém átomos de ferro ligados aos átomos de enxofre e a cadeias laterais de cisteína; encontrado nas cadeias transportadoras de elétrons, como aquelas nas mitocôndrias e nos cloroplastos.

centrômero
Região comprimida de um cromossomo mitótico que mantém cromátides-irmãs juntas; é também o sítio sobre o DNA onde o cinetocoro se forma e então captura microtúbulos do fuso mitótico.

centrossomo (centro celular)
Organela localizada no centro das células animais que atua como centro inicial de organização dos microtúbulos e forma o polo do fuso durante a mitose. Na maioria das células animais, ele contém um par de centríolos.

ciclina
Proteína cuja concentração aumenta e diminui periodicamente de acordo com o ciclo celular eucariótico. As ciclinas ativam proteína-cinases específicas *(ver* cinases dependentes de ciclinas) ajudando no controle da progressão de um estágio do ciclo celular para o próximo.

ciclo celular

Ciclo reprodutivo da célula: a sequência ordenada de eventos pela qual uma célula duplica seu conteúdo e se divide em duas.

ciclo do ácido cítrico (TCA ou ciclo do ácido tricarboxílico; ciclo de Krebs)

Via metabólica central em todos os organismos aeróbios que oxida grupos acetila derivados das moléculas dos alimentos até CO_2. Em células eucarióticas, essas reações ocorrem na matriz mitocondrial.

ciclo do centrossomo

Duplicação do centrossomo (durante a interfase) e separação de dois novos centrossomos (no início da mitose) para formar os polos do fuso mitótico.

cílio

Extensão semelhante ao cabelo sobre a superfície de uma célula, com um feixe central de microtúbulos capaz de fazer batimentos repetidos. Cílios, em grande número, dirigem o movimento de líquidos em camadas epiteliais, como nos pulmões.

cinase – *ver* proteína-cinase

cinesina

Uma grande família de proteínas motoras que usa a energia da hidrólise do ATP para se mover ao longo de um microbúbulo.

cinetocoro

Estrutura proteica complexa em um cromossomo mitótico ao qual microtúbulos se ligam. O cinetocoro se forma sobre parte do cromossomo conhecido como centrômero.

cis

Sobre o mesmo lado, por exemplo, a rede *cis de* Golgi é a parte mais próxima ao retículo endoplasmático.

citocina

Pequena proteína produzida e secretada por células que atuam sobre as células vizinhas para alterar seu comportamento. As citocinas atuam via receptores de citocina da superfície celular.

citocinese

Divisão do citoplasma de uma célula vegetal ou animal em dois, diferente da divisão do núcleo (que é a mitose).

citocromo

Proteína colorida contendo o grupo heme que transfere elétrons durante a respiração celular e a fotossíntese.

citoesqueleto

Sistema de filamentos proteicos no citoplasma de uma célula eucariótica que confere a forma da célula e a capacidade de movimento diferenciado. Seus componentes mais abundantes são filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários.

citoplasma

Conteúdos de uma célula que estão envolvidos pela membrana plasmática, mas excluindo o núcleo no caso de células eucarióticas.

citosol

Conteúdo do principal compartimento do citoplasma, excluindo organelas envoltas por membrana, como retículo endoplasmático e mitocôndria. A fração da célula mantida após a remoção da membrana, dos componentes do citoesqueleto e das outras organelas.

clatrina

Proteína que compõem a cobertura de um tipo de vesícula transportadora. As vesículas cobertas por clatrina brotam a partir do aparelho de Golgi na via secretora e brotam a partir da membrana plasmática na via endocítica.

clonagem

Fazer muitas cópias idênticas de uma célula, de uma molécula de DNA ou de um organismo.

clonagem de DNA, *ver* clonagem

clonagem reprodutiva

A produção artificial de cópias geneticamente idênticas de um animal pelo transplante, por exemplo, do núcleo de uma célula somática para um óvulo sem núcleo fertilizado.

clorofila

Pigmento que absorve luz e que tem função fundamental na fotossíntese.

cloroplasto

Organela especializada em algas e plantas que contêm clorofila; onde a fotossíntese ocorre.

código genético

Conjunto de regras especificando a correlação entre a trinca de nucleotídeos (códon) no DNA ou RNA e aminoácidos nas proteínas.

código proteico regulador

O conjunto de modificações covalentes que uma proteína possui em determinado momento que controla o comportamento da proteína dentro da célula.

códon

Sequência de três nucleotídeos em uma molécula de DNA ou RNA mensageiro que apresenta a instrução para a incorporação de um aminoácido específico em uma cadeia polipeptídica em formação.

coenzima A (CoA)

Molécula pequena usada na transferência enzimática de grupos acila na célula. *(Ver também* acetil-CoA e a Figura 3-36.)

coesina

Complexo proteico que forma um anel que prende cromátides-irmãs depois de o DNA ter sido replicado no ciclo celular.

colágeno

Proteína fibrosa rica em glicina e prolina que é o principal componente da matriz extracelular e do tecido conectivo. Existe em muitas formas: tipo I, o mais comum, encontrado na pele, nos tendões e nos ossos; tipo II, encontrado nas cartilagens, e tipo IV, que está presente na lâmina basal, e assim por diante.

colesterol

Molécula lipídica com uma estrutura característica de quatro anéis esteroides; importante componente da membrana plasmática das células animais. *(Ver* Figura 11-7.)

complementaridade

Descreve duas superfícies moleculares que se ajustam fortemente e formam ligações não covalentes entre elas. Exemplos incluem pares de bases complementares, como A e T, e as duas fitas complementares de uma molécula de DNA.

complexo
Uma coleção de macromoléculas, unidas por ligações não covalentes para formar um grande estrutura macromolecular. As associações de proteínas são chamadas de complexos proteicos; associações de proteínas e ácidos nucleicos são chamadas de complexos nucleoproteicos.

complexo de reconhecimento de origem (ORC)
Complexo proteico grande que está ligado ao DNA na origem de replicação nos cromossomos eucarióticos ao longo do ciclo celular.

complexo de remodelagem da cromatina
Enzima (normalmente multissubunidades) que usa a energia da hidrólise de ATP para alterar as interações histona-DNA nos cromossomos eucarióticos; a alteração resultante altera a acessibilidade do DNA subjacente por outras proteínas, incluindo aquelas envolvidas na transcrição.

complexo promotor de anáfase (APC)
Um complexo proteico que promove a destruição de proteínas específicas, catalisando sua ubiquitilação. É um componente crucial do sistema de controle do ciclo celular.

complexo proteico – *ver* complexo

comprimento de ligação
A distância entre dois átomos em uma molécula, geralmente aqueles ligados por uma ligação covalente.

condensação – *ver* condensação de cromossomos

condensação do cromossomo
Processo pelo qual um cromossomo se torna condensado em uma estrutura mais compacta antes da fase M do ciclo celular.

condensina
Complexos proteicos com uma estrutura em forma de anel que ajuda a realizar a condensação do cromossomo.

conformação
Arranjo espacial dos átomos de uma molécula. A forma precisa de uma proteína ou outra macromolécula em três dimensões.

constante de equilíbrio *(K)*
Número que caracteriza o estado estacionário alcançado por uma reação química reversível. Dada pela razão das constantes de velocidade direta e reversa de uma reação. *(Ver* Tabela 3-1, p. 96.)

controle combinatório
Descreve a via em que grupos de proteínas trabalham juntos para o controle da expressão de um único gene.

controle pós-transcricional
Regulação da expressão gênica que ocorre depois de a transcrição de um gene ter começado; exemplos são regulação do *splicing* de RNA e outros eventos de processamento do RNA e regulação da tradução por microRNA.

corpo basal, *ver* centríolo

córtex celular
Camada especializada do citoplasma sobre a face interna da membrana plasmática. Nas células animais, o córtex é uma camada rica em actina, responsável pelos movimentos da superfície celular.

cristalografia por raios X
Técnica utilizada para determinar as estruturas tridimensionais de proteínas por análise do padrão de difração de um feixe de raios X passados através de um cristal de proteína.

cromátide – *ver* cromátide-irmã

cromátide-irmã
Uma cópia de um cromossomo (uma cromátide) formada pela replicação do DNA que ainda está ligada pelo centrômero a outra cópia, o par de cromátides sendo conhecido como cromátides-irmãs.

cromatina
Complexo de DNA, histona e outras proteínas não histonas encontradas no núcleo de uma célula eucariótica. O material que forma os cromossomos.

cromatografia
Termo geral para um tipo de técnica utilizada para separar moléculas em uma mistura com base no seu tamanho, carga e habilidade em se ligar a um determinado grupo químico. Na forma comum da técnica, a mistura é aplicada em uma coluna preenchida com uma determinada matriz que é designada a ligar (ou deixar passar) a molécula de interesse.

cromossomo
Estrutura longa, composta de DNA e proteínas associadas que carregam a informação genética de um organismo. Especialmente visível quando células vegetais e animais sofrem mitose ou meiose.

cromossomo da interfase
Estado de um cromossomo eucariótico quando a célula está entre as divisões; esses cromossomos são ativos na transcrição e muito mais estendidos do que os cromossomos mitóticos.

cromossomo homólogo
Uma das duas cópias de um determinado cromossomo em uma célula diploide, sendo uma do pai e outra da mãe.

cromossomo mitótico
Cromossomo duplicado bastante condensado com dois novos cromossomos (também chamados de cromátides-irmãs) ainda juntos pelo centrômero. Cromossomo que ocorre durante um dos estágios da mitose.

cromossomo sexual
Cromossomo que pode estar presente ou ausente, ou presente em um número variável de cópias, de acordo com o sexo do indivíduo. Nos mamíferos, os cromossomos X e Y.

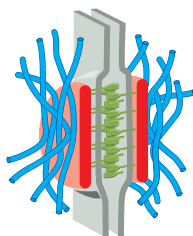
cromossomo X
Um dos dois cromossomos sexuais nos mamíferos. As células do homem possuem um cromossomo X e outro cromossomo Y.

cromossomo Y
Um dos dois cromossomos sexuais nos mamíferos. As células das mulheres possuem dois cromossomos X.

crossing-over
Processo pelo qual dois cromossomos homólogos se quebram em locais correspondentes e se ligam novamente para produzir dois cromossomos recombinados, resultando em uma troca física de segmentos de DNA.

DAG, *ver* diacilglicerol

dálton
Unidade de massa molecular. Definida como 1/12 da massa do átomo de carbono 12 (1,66 x 10^{-24} g); aproximadamente igual à massa de um átomo de hidrogênio.

desmossomo
Junção especializada célula-célula, geralmente formada entre duas células epiteliais, caracterizada por placas densas proteicas, nas quais se inserem filamentos intermediários das células adjacentes.

desnaturação
Causar uma mudança dramática na conformação de uma proteína ou ácido nucleico por aquecimento ou por exposição a reagentes químicos. Geralmente resulta na perda da função biológica.

detergente
Substância usada pelos bioquímicos para solubilizar proteínas de membrana.

diacilglicerol (DAG)
Lipídeo produzido pela clivagem do fosfolipídeo inositol da membrana em resposta aos sinais extracelulares. Composto de duas cadeias de ácidos graxos ligados ao glicerol, que serve como uma molécula de sinalização para ajudar a ativar a proteína-cinase C.

diferenciação
Processo pelo qual uma célula sofre uma mudança progressiva para um tipo celular especializado que é facilmente reconhecido.

difusão
A difusão de moléculas e pequenas partículas de um local para outro por movimentos térmicos aleatórios.

dímero
Uma estrutura composta de duas metades. Um homodímero é composto de duas subunidades idênticas, um heterodímero, de duas subunidades diferentes.

dineína
Membro de uma grande família de proteínas motoras que sofrem movimentos dependentes de ATP ao longo dos microtúbulos. As dineínas são responsáveis pela flexibilidade dos cílios.

diploide
Uma célula ou organismo contendo dois conjuntos de cromossomos homólogos e, portanto, duas cópias de cada gene ou lócus genético. (Ver *também* haploide.)

dispositivo molecular
Proteína ou complexo proteico que age em uma via de sinalização intracelular e pode mudar de forma reversível de um estado ativo a um inativo.

divergência
As diferenças por mutações que se acumulam em duas sequências de DNA derivadas de uma sequência ancestral comum.

divisão celular
Separação de uma célula em duas células-filhas. Em células eucarióticas, o processo consiste na divisão do núcleo (mitose), seguido pela divisão do citoplasma (citocinese).

DNA (ácido desoxirribonucleico)
Polinucleotídeo de fita dupla, formado por duas cadeias separadas de unidades de desoxirribonucleotídeo ligadas covalentemente. Serve como informação genética que é transmitida de geração em geração.

DNA complementar (cDNA)
Molécula de DNA sintetizada a partir de uma cópia de mRNA perdendo, dessa forma, os íntrons que estão presentes no DNA genômico. Usado para determinar a sequência de aminoácidos de uma proteína pelo sequenciamento do DNA ou fazendo grandes quantidades da proteína por clonagem seguida pela expressão.

DNA ligase – *ver* ligase

DNA-polimerase – *ver* polimerase

DNA recombinante
Uma molécula de DNA que é composta de DNA de diferentes fontes.

doador de elétron
Molécula que facilmente doa um elétron e se torna oxidada no processo.

dogma central
O princípio de que o fluxo de informação genética passa do DNA para o RNA e para a proteína.

domínio
Região pequena discreta de uma estrutura. Um domínio de proteína é uma região dobrada, estável e compacta de polipeptídeos. Um domínio de membrana é uma região de camada dupla com uma composição característica de lipídeos e proteínas.

domínio de membrana
Região funcionalmente especializada em uma membrana celular, caracterizada pela presença de determinadas proteínas.

domínio de proteína – *ver* domínio

dupla-hélice
A conformação típica de uma molécula de DNA em que duas fitas polipeptídicas são enroladas uma na outra com o pareamento de bases entre as fitas.

duplicação gênica
A duplicação acidental de um gene (ou uma extensão de DNA contendo vários genes) no genoma. As duas cópias resultantes de um gene podem então divergir pelo acúmulo de mutações. Famílias gênicas surgem por uma série de eventos de duplicação gênica.

elemento
Substância que não pode ser quebrada em qualquer outra forma química; composta de um único tipo de átomo.

elemento genético móvel
Pequenos segmentos de DNA que podem se mover, algumas vezes através de um RNA intermediário, de um local do genoma para outro. Eles são uma importante fonte de variação genética na maioria dos genomas.

eletroforese
Técnica para separar uma mistura de proteínas de fragmentos de DNA por tamanho e carga elétrica, colocando-os em um gel de polímero e submetendo-os a um campo elétrico. As moléculas migram pelo gel em diferentes velocidades dependendo do seu tamanho e carga.

elétron
Partícula subatômica fundamental com uma unidade de carga negativa (e^-).

embaralhamento de éxons
Processo evolutivo pelo qual novos genes se formam pelas combinações de éxons separados inicialmente codificando domínios de proteínas diferentes.

endocitose
Captação de material para dentro da célula pela invaginação da membrana plasmática e sua internalização em uma vesícula envolta por membrana. (*Ver também* pinocitose e fagocitose.)

endocitose mediada por receptor
Mecanismo de captação seletiva pelas células animais em que uma macromolécula se liga ao receptor na membrana plasmática e entra na célula em vesículas cobertas por clatrina.

endossomo
Compartimento envolto por membrana de uma célula eucariótica por onde o material endocitado passa para o lissossomo.

energia de ativação
Energia extra que uma molécula deve obter para sofrer uma determinada reação química.

energia de ligação
A força da ligação química entre dois átomos, medida pela energia em quilocalorias necessária para quebrá-la.

energia livre (*G*)
Energia que pode ser obtida de um sistema para realizar um trabalho, como promover uma reação química. O padrão de energia livre de uma substância, G°, é a sua energia livre medida em uma concentração, temperatura e pressão definidas.

engenharia genética – *ver* tecnologia de DNA recombinante

entropia
Quantidade termodinâmica que mede o grau de desordem de um sistema; quanto maior entropia, maior desordem.

envelope nuclear
Membrana dupla que envolve o núcleo. Consiste em membranas interna e externa trespassadas por poros nucleares.

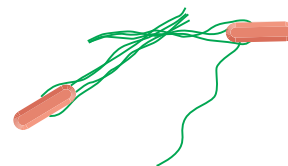
enzima
Uma proteína que catalisa uma reação química específica.

epitélio
Camada de células que cobrem ou revestem uma superfície externa ou cavidade do corpo.

equação de Nernst
Expressão quantitativa que relata a razão do equilíbrio de concentração de um íon sobre ambos os lados de uma membrana permeável pela diferença de voltagem através da membrana.

equilíbrio
Em um contexto químico, é um estado em que duas ou mais reações estão procedendo a uma velocidade tal que elas equilibram uma à outra e mudanças químicas resultantes não estão ocorrendo.

escala de pH
Escala usada para medir a acidez de uma solução: "p" refere-se à potência de 10, e "H", ao hidrogênio. Definido como logaritmo negativo da concentração do íon hidrogênio em mols por litro (M). Então uma solução ácida com pH 3 conterá 10^{-3}M de íons hidrogênio.

***Escherichia coli* (*E. coli*)**
Bactéria em forma de bastonete, normalmente encontrada no cólon dos humanos e de outros mamíferos, e amplamente usada na pesquisa biomédica.

especificidade
Afinidade seletiva de uma molécula por outra que permite que as duas se liguem ou reajem em presença de qualquer espécie molecular não relacionada.

espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)
Técnica utilizada para determinar a estrutura tridimensional de uma proteína; é realizada em solução sem a necessidade de uma proteína cristalizada.

esqueleto de polipeptídeo
A cadeia de átomos que contém repetidas ligações peptídicas que ocorrem em uma molécula proteica e às quais as cadeias laterais dos aminoácidos se ligam.

estado de transição
Estrutura química que se forma transitoriamente no curso de uma reação e tem maior energia livre do que qualquer intermediário de reação.

estimulador
Sequência de DNA reguladora onde reguladores transcricionais se ligam, influenciando a taxa de transcrição de um gene estrutural que pode estar a milhares de pares de bases de distância.

estroma
(1) O tecido conectivo no qual um epitélio glandular ou outro estão embebidos. (2) O espaço interno grande de um cloroplasto, contendo enzimas que incorporam CO_2 em açúcares no estágio de fixação de carbono da fotossíntese.

estrutura secundária
Padrão de dobramento regular de uma molécula polimérica. Nas proteínas, refere-se a α-hélices e folhas β.

eubactéria
O termo apropriado para bactérias de ocorrência comum, usado para distingui-las das Archaea.

eucarioto
Organismos vivos compostos de uma ou mais células com um núcleo e um citoplasma distintos. Incluem todas as formas de vida com exceção de archaea e bactérias (procariotos) e vírus.

eucromatina
um dos dois principais estados no qual a cromatina existe dentro de uma célula em interfase, sendo a outra a heterocromatina. Caracterizada por determinadas modificações nas histonas e proteínas associadas; genes na eucromatina geralmente são capazes de ser expressados.

evolução
A mudança gradual em organismos vivos ocorrendo ao longo de gerações que resulta em novas espécies sendo formadas.

exocitose
Processo pelo qual a maioria das moléculas é secretada de uma célula eucariótica. Essas moléculas são empacotadas em vesículas envoltas por membrana que se fundem com a membrana plasmática, liberando seu conteúdo para o meio externo.

éxon
Segmento de um gene eucariótico que é transcrito no RNA e expresso; dita a sequência de aminoácidos de parte de uma proteína.

expressão gênica
O processo pelo qual um gene faz seu efeito sobre uma célula ou organismo, geralmente pelo direcionamento da síntese de uma proteína ou uma molécula de RNA com uma atividade característica.

FAD – *ver* $FADH_2$

$FADH_2$ (flavina adenina dinucleotídeo reduzida)
Principal carreador de elétrons no metabolismo produzido pela redução de FAD durante a oxidação de catabólitos como sucinato.

fagocitose
O processo pelo qual partículas são engolfadas ("comidas") por uma célula. Proeminente nas células predatórias, como *Amoeba proteus*, e em células do sistema imune dos vertebrados, como macrófagos.

família Bcl-2
Família de proteínas intracelulares que promovem ou inibem a apoptose, regulando a ativação das caspases.

família da proteína Rho
Família de pequenas GTPases envolvidas na sinalização que causa o rearranjo do citoesqueleto de actina.

família de proteínas
Um grupo de proteínas em um organismo com uma sequência de aminoácidos similar. Acredita-se que a similaridade reflete a evolução de um gene que codifica proteínas de um gene ancestral comum por meio de um processo de duplicação de gene seguido pela divergência do gene. Geralmente, os membros diferentes de uma família de proteína terão uma relação, mas funções distintas. Por exemplo, cada membro de uma família de proteína-cinase realiza uma reação de fosforilação similar, mas o substrato e a regulação serão diferentes para cada enzima.

fase de leitura
O conjunto de tripletes sucessivos em que uma cadeia de nucleotídeos é traduzida em proteína. Uma molécula de mRNA é lida em uma das três possível fases de leitura, dependendo do ponto de início.

fase G_1
Fase de intervalo 1 do ciclo celular eucariótico, entre o final da citocinese e o início da síntese de DNA.

fase G_2
Fase de intervalo 2 do ciclo celular eucariótico, entre o final da síntese de DNA e o início da mitose.

fase M
Período do ciclo celular eucariótico onde o núcleo e o citoplasma se dividem.

fase S
Período durante um ciclo celular eucariótico em que o DNA é sintetizado.

fator de crescimento
Molécula de sinalização polipeptídica extracelular que estimula uma célula a crescer ou proliferar. Exemplos são o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).

fator de iniciação
Proteína que promove a associação apropriada de ribossomos com o mRNA e é necessária para a inibição da síntese de proteína.

fator de iniciação de tradução
Proteína que promove a associação apropriada do ribossomo com o mRNA e é necessária para o início da síntese de proteína.

fator de sobrevivência
Molécula de sinalização extracelular que deve estar presente para prevenir a apoptose.

fator de transcrição
Termo indiscriminadamente aplicado para qualquer proteína necessária para iniciar ou regular a transcrição em eucariotos. Inclui reguladores da transcrição, bem como os fatores gerais de transcrição.

fator geral de transcrição
Proteínas que se montam sobre os promotores de vários genes eucarióticos próximos ao local de início da transcrição e colocam a RNA-polimerase na posição correta.

fenótipo
A característica observável de uma célula ou um organismo.

fermentação
A quebra de moléculas orgânicas sem o envolvimento de oxigênio molecular. Essa forma de oxidação é menos completa do que em processos aeróbios e produz menos energia.

fertilização
Sequência de eventos que inicia quando um espermatozoide faz contato com o óvulo e conduz a sua fusão e posterior desenvolvimento.

fibroblasto
Tipo celular comum encontrado do tecido conectivo que secreta a matriz extracelular rica em colágeno e outras macromoléculas da matriz extracelular. Migram e se proliferam rapidamente em tecido machucado e em cultura de células.

fibronectina
Proteína da matriz extracelular que se liga a integrinas sobre a superfície celular, ajudando as células a se aderirem à matriz.

filamento de actina

Filamento proteico, com aproximadamente 7 nm de espessura, formado a partir de uma cadeia de moléculas globulares de actina. Principal constituinte do citoesqueleto de todas as células eucarióticas e especialmente abundante nas células musculares.

filamento intermediário
Filamento de proteína fibrosa (em torno de 10 nm de diâmetro) que forma feixes com forma de corda em células animais. Muitas vezes usado como um elemento estrutural que resiste à tensão externa aplicada na célula.

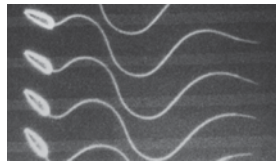
filopódio
Extensão contendo actina, delgada e longa, sobre a superfície de uma célula animal. Algumas vezes tem uma função exploratória, como em um cone de crescimento.

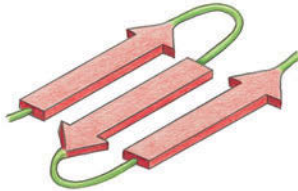
fita-líder
Uma das duas fitas do DNA recém-sintetizada encontrada na forquilha de replicação. A fita-líder é feita pela síntese contínua na direção 5′ para 3′.

fita retardada
Uma das duas fitas recém-sintetizadas do DNA encontradas na forquilha de replicação. A fita retardada é feita em segmentos descontínuos que posteriormente são ligadas covalentemente.

fixação de carbono
Processo pelo qual plantas verdes incorporam átomos de carbono do dióxido de carbono atmosférico nos açúcares. O segundo estágio da fotossíntese.

fixação de nitrogênio
Conversão de nitrogênio da atmosfera em moléculas orgânicas que contêm nitrogênio pelas bactérias de solo e cianobactérias.

flagelo
Protrusão longa, em forma de chicote, que dirige uma célula por um meio líquido através de movimento ondulatório. O flagelo de células eucarióticas são versões mais longas do cílio; flagelos bacterianos são completamente diferentes, são construções menores e mais simples.

folha β – *ver* **folha beta**

folha beta (folha β)
Padrão de dobramento encontrado em muitas proteínas, em que regiões próximas da cadeia polipeptídica se associam por pontes de hidrogênio para formar em uma estrutura rígida e achatada.

força de van der Waals
Força de atração devida a cargas elétricas dispersas que ocorre entre dois átomos que estão separados a 0,3 a 0,4 nm. Em uma pequena distância, forças de repulsão começam a operar.

forquilha de replicação
Região em forma de Y de uma molécula de DNA em replicação onde as duas fitas-filhas são formadas e separadas.

fosfatidilcolina
Fosfolipídeo comum presente em abundância na maioria das membranas biológicas. *(Ver* Figura 11-6.)

fosfoinositidio-3-cinase (PI-3-cinase)
Enzima que fosforila fosfolipídeos inositol na membrana plasmática em resposta a sinais recebidos por uma célula. Os lipídeos fosforilados se tornam pontos de ancoragem para proteínas de sinalização intracelular.

fosfolipase C
Enzima associada à membrana plasmática que realiza uma etapa crucial na via de sinalização do fosfolipídeo inositol.

fosfolipídeo
Tipo de molécula lipídica usada para fazer as membranas biológicas. Geralmente composta de dois ácidos graxos ligados através do glicerol fosfato a uma variedade de grupos polares.

fosfolipídeos inositol (fosfoinosídeos)
Componentes lipídicos minoritários da membrana plasmática que contêm derivados do inositol fosforilado; importante tanto para distinguir entre membranas intracelulares como para transdução de sinal nas células eucarióticas.

Fosforilação – *ver* **fosforilação de proteínas**

fosforilação de proteínas
A adição covalente de um grupo fosfato a uma cadeia lateral de uma proteína catalisada por uma proteína-cinase. A fosforilação normalmente altera a atividade ou as propriedades da proteína de alguma forma.

fosforilação oxidativa
Processo na bactéria ou mitocôndria em que a formação de ATP é dirigida pela transferência de elétrons das moléculas dos nutrientes para oxigênio molecular. Envolve a formação de intermediários de um gradiente de pH através de uma membrana e de um acoplamento quimiosmótico.

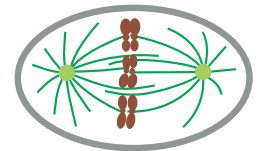
fotofosforilação cíclica
Processo fotossintético envolvendo apenas o fotossistema I, pelo qual cloroplastos podem gerar ATP sem fazer NADPH.

fotossíntese
O processo pelo qual plantas e algumas bactérias usam a energia da luz solar para dirigir a síntese de moléculas orgânicas a partir do dióxido de carbono e da água.

fotossistema
Grande complexo multiproteico que contém clorofila que capta a energia da luz.

fragmentos de Okazaki
Pequenas sequências de DNA produzidas na fita retardada durante a replicação do DNA. Fragmentos adjacentes são rapidamente unidos pela DNA-ligase para formar uma fita contínua de DNA.

fragmoplasto
Estrutura feita de microtúbulos e vesículas de membrana que se formam na região equatorial de uma célula vegetal em divisão e da qual a membrana que divide as células-filhas será feita.

fuso mitótico
Arranjo dos microtúbulos e de moléculas associadas que se formam entre os polos opostos de uma célula eucariótica durante a mitose; durante a separação dos cromossomos duplicados, o fuso serve para separar os dois conjuntos de cromossomos.

G*, *ΔG*, *ΔG° – *ver* **energia livre, variação de energia livre**

G_1 – Cdk
Cinase dependente de ciclina cuja atividade dirige a célula através da fase G_1.

G_1/S-Cdk
Cinase dependente de ciclina cuja atividade aciona a entrada na fase S do ciclo celular.

GAG – *ver* **glicosaminoglicano**

gameta – *ver* **célula germinativa**

GDP (5′-difosfato de guanosina)
Nucleotídeo que é produzido pela hidrólise do fosfato terminal de GTP, uma reação que também produz fosfato inorgânico. Quando livre em solução, GDP é rapidamente fosforilado para GTP, geralmente pela transferência do fosfato terminal do ATP na reação ATP + GDP → ADP + GTP.

gene
Região do DNA que controla uma característica hereditária discreta de um organismo, geralmente responsável por especificar uma única proteína ou molécula de RNA.

gene homólogo – *ver* homólogos

gene repórter
Gene introduzido que codifica para uma proteína cuja atividade é fácil de monitorar experimentalmente. O gene normalmente é ligado a uma sequencia reguladora, que então acionará o gene repórter no contexto normal, no qual seu próprio gene é expressado normalmente.

gene supressor de tumor
Um gene que em uma célula de tecido normal inibe o progresso pelo ciclo celular. A perda ou inativação de ambas as cópias de tal gene de uma célula diploide pode fazer com que essa se divida como uma célula cancerosa.

genética
Estudo dos genes de um organismo com base na hereditariedade e na variação.

genoma
A informação genética total carregada por uma célula ou um organismo (ou as moléculas de DNA que carregam essa informação).

genótipo
Conjunto de genes carregados por uma célula individual ou organismo.

glicogênio
Polissacarídeo composto exclusivamente de unidades de glicose, usado para armazenar energia nas células animais. Grânulos grandes de glicogênio estão especialmente abundantes no fígado e nas células musculares.

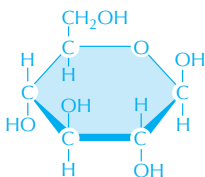
glicolipídeo
Molécula de lipídeo de membrana com uma pequena cadeia de carboidrato ligada a uma cauda hidrofóbica.

glicólise
Via metabólica universal onde açúcares são parcialmente degradados no citosol, com produção de ATP. (Literalmente, "quebrando açúcar".)

gliconeogênese
A síntese de glicose a partir de moléculas orgânicas pequenas, como lactato, piruvato ou aminoácidos.

glicoproteína
Qualquer proteína com uma ou mais cadeias de oligossacarídeos ligadas covalentemente. Incluem a maioria das proteínas secretadas e a maioria das proteínas expostas na superfície externa da membrana plasmática.

glicosaminoglicano (GAG)
Família de polissacarídeos de alto peso molecular que contém aminoaçúcares; encontrado como capa protetora ao redor das células animais.

glicose
Açúcar de seis carbonos que tem um papel importante no metabolismo das células vivas. Armazenada na forma polimérica como glicogênio em células animais e como amido nas células vegetais. *(Ver* Painel 2-3, p. 68-69.)

gordura
Lipídeos usados pelas células vivas para armazenar a energia metabólica. Composto principalmente de triacilglicerol. *(Ver* Painel 2-4, p. 70-71.)

gradiente eletroquímico
Força que causa o movimento dos íons através de uma membrana. Causado pela diferença na concentração iônica e na carga elétrica sobre ambos os lados da membrana.

grupo – *ver* grupo químico

grupo acetila
Grupo químico derivado do ácido acético.

grupo acila
Grupo funcional derivado de um ácido carboxílico (R representa um grupo alquil, como metila).

grupo alquil
Termo geral para um grupo de átomos de carbono e hidrogênio ligados covalentemente, como os grupos metila (– CH_3) ou etila (– CH_2CH_3). Algumas vezes abreviado como R.

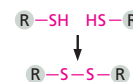
grupo amino
Grupo funcional básico fraco (– NH_2) derivado da amônia. Em solução aquosa, um grupo amino pode aceitar um próton e carregar uma carga positiva. (*Ver* Painel 2-1, p. 64-65.)

grupo carbonila
Par de átomos que consiste em um átomo de carbono ligado a um átomo de oxigênio por uma ligação dupla. (*Ver* Painel 2-1, p. 64-65.)

grupo carboxila
Átomo de carbono ligado a um átomo de oxigênio por uma ligação dupla e a um grupo hidroxila. Moléculas contendo um grupo carboxila são ácidos fracos (carboxílico). (*Ver* Painel 2-1, p. 64-65.)

grupo metila (–CH_3)
Grupo químico hidrofóbico derivado do metano (CH_4). (*Ver* Painel 2-1, p. 64-65.)

grupo químico
Conjunto de átomos ligados covalentemente, como um grupo hidroxila (– OH) ou um grupo amino (– NH_2), que ocorre em muitas moléculas diferentes e possui um caráter químico distinto.

grupo sulfidrila (– SH, tiol)
Grupo químico que contém enxofre e hidrogênio encontrado no aminoácido cisteína e em outras moléculas. Dois grupos sulfidrila podem ligar-se para produzir uma ponte dissulfeto.

GTP (5'– trifosfato de guanosina)
Principal nucleotídeo trifosfatado usado na síntese de RNA e em algumas reações de transferência de energia. Tem um papel especial na montagem dos microtúbulos, na síntese de proteína e na sinalização celular.

GTPase monomérica
Pequena proteína de ligação à GTP, de uma única subunidade. Proteínas dessa família, como Ras e Rho, são parte de várias vias de sinalização diferentes.

haploide
Uma célula ou um organismo com apenas um conjunto de cromossomos, como em um espermatozoide ou uma bactéria. *(Ver também* diploide.)

hélice
Estrutura alongada em que um filamento ou uma fita se enrolam de um modo regular ao redor de um eixo central.

hemidesmossomo
Junção celular especializada de ancoramento entre células epiteliais e a lâmina basal subjacente.

herança epigenética
Herança que é sobreposta na informação herdada na própria sequência de DNA. Muitas vezes, a informação na forma de um determinado tipo de estrutura de cromatina (um certo padrão de modificação de histona ou metilação de DNA).

hereditariedade
A transmissão de uma geração para outra de fatores genéticos que determinam as características do indivíduo. Responsável pela similaridade entre pais e filhos.

heredograma
Uma linhagem de um descendente, ou ancestral, de um único animal

heterocromatina
Região de um cromossomo que se mantém curiosamente condensada e inativa transcricionalmente durante a interfase.

heterozigoto
Um organismo com alelos dissimilares para um determinado gene.

hibridização
Processo experimental em que duas fitas de ácidos nucleicos complementares formam uma dupla-hélice; uma técnica poderosa para a detecção de sequências de nucleotídeos específicas.

hibridização *in situ*
Técnica em que uma sonda de fita simples de RNA ou DNA é usada para localizar um gene ou uma molécula de mRNA em uma célula ou tecido.

hidrofílico
Molécula polar ou parte de uma molécula que forma pontes de hidrogênio com a água, suficientes para se dissolver rapidamente. (Literalmente, "adoram água".)

hidrofóbico
Molécula apolar ou parte de uma molécula que não pode formar interações favoráveis com as moléculas de água e, portanto, não se dissolve em água. (Literalmente, "odeiam água".)

hidrólise (adjetivo hidrolítico)
Clivagem de uma ligação covalente com a adição de água, sendo adicionado –H em um dos produtos de clivagem e –OH em outro.

hidroxila (–OH)
Grupo químico que se constitui de um átomo de hidrogênio ligado a um oxigênio, como em um álcool. (*Ver* Painel 2-1, p. 64-65.)

histona
Membro do grupo de proteínas de caráter básico, rico em arginina e lisina, que está associada ao DNA no cromossomo para formar nucleossomos.

histona-desacetilase
Enzima que remove os grupos acetila das lisinas presentes nas histonas; o estado de acetilação das histonas age como um sinal que atrai outras proteínas que ativam e inibem a transcrição.

homólogo
(1) *Ver* cromossomo homólogo. (2) Qualquer estrutura ou macromolécula que possui muitas semelhanças com outra como resultado de um ancestral comum.

homólogos
Descreve órgãos ou moléculas que são similares por sua origem evolucionária comum; descreve geralmente similaridades na sequência de proteínas ou ácidos nucleicos.

homozigoto
Descreve um organismo que tem alelos idênticos para um dado gene.

hormônio
Uma substância química produzida por um grupo de células em um organismo multicelular e transportada via líquidos corporais para o tecido-alvo onde ele exerce um efeito específico.

hormônio esteroide
Molécula lipofílica relacionada ao colesterol que age como hormônio. Exemplos incluem estrogênio e testosterona.

inibição por retroalimentação
Uma forma de controle metabólico em que o produto final de uma cadeia de reações enzimáticas reduz a atividade de uma enzima no início da via.

iniciador
Na replicação de DNA, um pedaço curto de RNA produzido no início de um evento de síntese de DNA catalisado pela DNA-polimerase; esses iniciadores de RNA são removidos subsequentemente e preenchidos com DNA.

iniciador de RNA – *ver* iniciador

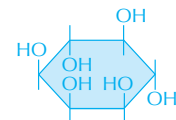
instabilidade dinâmica
A propriedade mostrada pelos microtúbulos de crescimento e retração repetidamente, por meio da adição e perda de subunidades de tubulina em suas extremidades expostas.

instabilidade genética
Taxa de mutação aumentada observada nas células de câncer, por exemplo, resultante da presença de mutações que interferem na replicação e na manutenção acuradas do genoma.

íon
Um átomo carregando uma carga elétrica, positiva ou negativa.

íon hidrogênio
Termo geralmente usado para um próton (H^+) em solução aquosa, a base da acidez. Uma vez que o próton se combina rapidamente com uma molécula de água para formar H_3O^+, é mais correto chamá-lo de íon hidrônio. (*Ver* Painel 2-2, p. 66-67.)

íons hidrônio (H_3O^+)
A forma obtida por um próton (H^+) em solução aquosa. (*Ver* Painel 2-2, p. 66-67.)

inositol
Molécula de açúcar com seis grupos hidroxila que forma a estrutura para o fosfolipídeo inositol.

inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3)
Pequena molécula de sinalização intracelular que é produzida durante a ativação da via de sinalização do fosfolipídeo inositol para liberar Ca^{+2} do retículo endoplasmático.

insaturado
Descreve uma molécula que contém uma ou mais ligações duplas ou triplas entre carbonos.

integrina
Família de proteínas transmembrana presentes na superfície celular que permite às células se aderirem umas às outras e à matriz extracelular, estando também envolvida na sinalização celular.

interfase
Período longo do ciclo celular entre uma mitose e outra. Inclui a fase G_1, fase S e fase G_2.

íntron
Região não codificante de um gene eucariótico que é transcrita na molécula de RNA, mas é retirada pelo *splicing* do RNA para produzir mRNA.

in vitro
Termo usado pelos bioquímicos para descrever um processo que ocorre em um extrato isolado livre de células. Também usado pelos biólogos celulares para se referir a células cultivadas em cultura (*in vitro*), ao contrário das crescidas em um organismo (*in vivo*). (Latim: "em frasco".)

in vivo
Em uma célula ou organismo intacto. (Latim: "em vida".)

IP_3 – *ver* inositol 1, 4, 5-trifosfato

isômero (estereoisômero)
Uma de duas ou mais substâncias que contém os mesmos átomos e tem a mesma fórmula molecular (como $C_6H_{12}O_6$), mas se diferenciam no arranjo espacial dos átomos. Isômeros ópticos diferem apenas por serem imagens espelhadas um do outro.

isótopos
Duas ou mais formas de um átomo que tem a mesma química, mas diferem no peso atômico. Podem ser estáveis ou radioativos.

junção celular
Região especializada de conexão entre duas células ou entre uma célula e a matriz extracelular.

junção compacta
Junção célula-célula que sela células epiteliais adjacentes, prevenindo a passagem da maioria das moléculas dissolvidas de um lado para outro da camada epitelial.

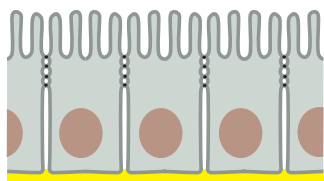
junção tipo fenda
Junção célula-célula de comunicação que permite que íons e moléculas pequenas passem do citoplasma de uma célula para o citoplasma da próxima.

junções aderentes
Junções celulares em que a face citoplasmática está ligada a filamentos de actina.

***K* – *ver* constante de equilíbrio**

K^+
Íons potássio – o principal componente iônico das células vivas.

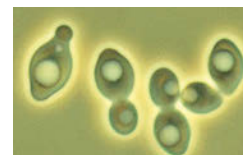
K_M
A concentração de substrato em que uma enzima trabalha na metade da sua velocidade máxima. Valores altos de K_m geralmente indicam que a enzima se liga ao substrato com afinidade relativamente baixa.

lâmina basal
Camada delgada da matriz extracelular que separa as camadas epiteliais e muitos outros tipos celulares, como células musculares ou células adiposas do tecido. Chamadas também de membrana basal.

lâmina nuclear
Camada fibrosa sobre a superfície interna da membrana nuclear interna feita de uma rede de filamentos intermediários feitos de laminas nucleares.

lamelipódio
Extensão dinâmica semelhante a uma folha sobre a superfície de uma célula animal, especialmente de uma que esteja migrando em uma superfície.

lei da segregação
A primeira lei da hereditariedade, derivada por Mendel, que diz que os alelos paternos e maternos para um fenótipo se separam um do outro durante a formação do gameta e então se reúnem durante a fertilização.

lei do arranjo independente
A segunda lei da hereditariedade, derivada por Mendel, postulando que, durante a formação do gameta, os alelos para diferentes fenótipos segregam independentemente um do outro.

levedura
Termo comum para algumas famílias de fungos unicelulares (células eucarióticas usadas como organismos-modelo). Incluem espécies usadas para fermentar a cerveja e fazer pão, bem como espécies que causam doenças.

Ligação – *ver* ligação química

ligação covalente
Ligação química estável entre dois átomos formada pelo compartilhamento de um ou mais pares de elétrons.

ligação de alta energia
Ligação covalente cuja hidrólise libera uma grande quantidade de energia livre sob as condições existentes em uma célula. Exemplos incluem a ligação fosfodiéster no ATP e a tioéster na acetil-CoA.

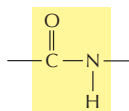
ligação de extremidades não homólogas
Mecanismo para reparo de quebras no DNA de fita dupla no qual as duas extremidades quebradas são reunidas sem a necessidade de homologia na sequência.

ligação dupla
Um tipo de ligação química entre dois átomos formados pelo compartilhamento de quatro elétrons.

ligação fosfodiéster
Uma ligação química covalente na qual dois átomos de carbono são ligados em ligação éster (pelos átomos de oxigênio) ao mesmo grupo fosfato; as ligações fosfodiéster ligam os nucleotídeos adjacentes no RNA ou DNA. (*Ver* Figura 2-25.)

ligação iônica
Força de atração que mantém dois íons juntos, um positivo e outro negativo.

ligação não covalente
Ligação química em que, em contraste com a ligação covalente, elétrons não são compartilhados. Ligações não covalentes são relativamente fracas, mas podem se somar umas às outras para produzir interações altamente específicas fortes entre moléculas. Exemplos são pontes de hidrogênio e interações van der Waals.

ligação peptídica
Ligação química entre o grupo carbonila de um aminoácido e o grupo amino de um segundo aminoácido – uma forma especial de ligação amida. (*Ver* Painel 2-5, p. 72-73.)

ligação química
Afinidade química entre dois átomos que os mantêm unidos. Os tipos encontrados em células vivas incluem ligação iônica, ligação covalente, ligação polar e pontes de hidrogênio.

ligação tioéster
Ligação de alta energia formada por uma reação de condensação entre um grupo ácido (acila) e um grupo tiol (– SH); vê-se, por exemplo, na acetil-CoA e em muitos complexos enzima-substrato.

ligante
Termo geral para uma molécula que se liga a um sítio específico de uma proteína.

ligase
Enzima que liga duas fitas de DNA por suas extremidades.

linfócito
Células brancas do sangue que fazem a mediação da resposta imune a uma molécula estranha (um antígeno). Linfócitos são tipos de células B secretando anticorpos ou tipo de célula T que regulam as respostas e também formam o sistema de resposta imune mediado por células.

linhagem de célula
População de células de origem vegetal ou animal capaz de se dividir indefinidamente em cultura.

linhagem germinativa
A linhagem de células reprodutivas que contribui para a formação de uma nova geração de organismos, distinguindo-se das células somáticas, que formam o corpo e não deixam descendentes na próxima geração.

lipídeo
Molécula orgânica que é insolúvel em água, mas se dissolve rapidamente em solventes orgânicos apolares. Uma classe, os fosfolipídeos, forma a base estrutural de membranas biológicas.

lisossomo
Organela envolta por membrana que contém enzimas digestórias, geralmente aquelas mais ativas em pH ácido encontradas nessas organelas.

locomoção celular
Movimento ativo de uma célula de um local para outro.

lúmen
Cavidade envolvida por uma camada epitelial (em um tecido) ou por uma membrana (em uma célula), como no lúmen do retículo endoplasmático. (Do latim, *lúmen,* luz, abertura.)

M-Cdk
Complexo proteico ativo formado no início da fase M do ciclo celular por uma ciclina-M e pela cinase dependente de ciclina mitótica (Cdk).

M-ciclina
Ciclina que se liga à Cdk mitótica para formar M-Cdk no início da fase M do ciclo celular.

macrófago
Célula encontrada em tecidos animais que é especializada em captar partículas por fagocitose; derivado de um tipo de células brancas do sangue.

macromolécula
Molécula, como uma proteína, ácido nucleico ou polissacarídeo, com uma massa molecular maior do que alguns milhares de dáltons. (Do grego, *macros,* grande.)

MAP-cinase
Proteína-cinase ativada por mitógeno. Proteína-cinase que realiza uma etapa crucial na transmissão de sinais a partir de receptores de superfície celular para o núcleo. Ela é a cinase final em uma sequência de 3 cinases chamada de cascata da MAP-cinase.

mapa genético
Uma representação gráfica da ordem dos genes nos cromossomos, distribuídos de acordo com a quantidade de recombinações que ocorrem entre eles.

máquina de proteína
Um conjunto de moléculas proteicas que se ligam em vias específicas, de modo que movimentos concertados dentro do complexo proteico podem realizar uma sequência de reações com velocidade e eficiência pouco comuns. Um grande número das reações centrais da célula são catalisadas por máquinas de proteínas, com síntese de proteína e replicação do DNA sendo particularmente exemplos bem entendidos.

matriz
Geralmente, um espaço interno onde algo é formado. Na biologia celular, essa palavra geralmente se refere ao compartimento interno maior da mitocôndria. A matriz mitocondrial contém uma mistura concentrada de enzimas especiais que catalisam reações de oxidação, bem como o genoma mitocondrial e as proteínas necessárias para expressar os genes mitocondriais. (*Ver* Figura 14-4.)

matriz extracelular
Rede complexa de polissacarídeos (como glicosaminoglicanos ou celulose) e proteínas (como colágeno) secretada pela célula. Um componente estrutural do tecido que também influencia no seu desenvolvimento e fisiologia.

mediador local
Molécula-sinal secretada que age em pequenas áreas sobre células adjacentes.

meiose
Tipo especial de divisão celular em que os óvulos e o espermatozoides são produzidos. Duas divisões nucleares sucessivas com apenas um ciclo de replicação do DNA gera quatro células-filhas haploides a partir de uma célula diploide. (Do grego, *meiosis,* diminuição.)

membrana
Fina camada de moléculas de lipídeos e proteínas associadas que envolve todas as células e que limita muitas organelas eucarióticas.

membrana plasmática
Membrana que envolve as células vivas.

memória celular
A habilidade das células e suas descendentes, sem sofrer qualquer alteração da sequência do DNA, de manter traços de efeitos de influências passadas, mostrando as consequências em padrões persistentemente alterados na expressão gênica.

metabolismo
Todas as reações químicas que acontecem na célula de um organismo vivo resultando no crescimento, na divisão, na produção de energia e na excreção.

metáfase
Estágio da mitose em que cromossomos são ligados firmemente ao fuso mitótico e dispostos no centro do fuso, mas ainda não foram segregados para os polos opostos.

metástase
A disseminação de células cancerosas pelo corpo a partir do local inicial do tumor.

metilação de DNA
A adição enzimática de grupos metila a bases de citosina no DNA. A metilação geralmente desliga genes por meio da atração de proteínas que bloqueiam a expressão gênica.

microarranjo de DNA
Uma lâmina de vidro onde um grande número de pequenas moléculas de DNA (tipicamente dezenas de milhares) foram imobilizadas em um padrão ordenado. Cada um desses fragmentos funciona como uma sonda para um gene específico, permitindo que os produtos de RNA de milhares de genes sejam monitorados ao mesmo tempo.

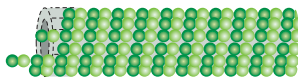
micro
Prefixo que simboliza 10^{-6}.

micrômetro (μm)
Unidade de medida aplicada para células e organelas. Igual a 10^{-6} metros ou 10^{-4} centímetros.

micrografia
Fotografia obtida através de um microscópio. Tanto micrografia óptica como micrografia eletrônica, dependendo do tipo de microscópio usado.

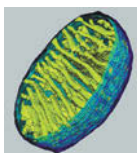
microRNA (miRNA)
Pequenos RNAs não codificantes que controlam a expressão gênica pelo pareamento de bases com mRNAs específicos para regular sua estabilidade e sua tradução.

microscópio
Instrumento para a visualização de objetos extremamente pequenos. Um microscópio óptico utiliza um feixe de luz visível e é utilizado para observar células e organelas. Um microscópio eletrônico utiliza um feixe de elétrons e pode ser utilizado para analisar objetos tão pequenos como moléculas individuais.

microtúbulo
Longa estrutura cilíndrica composta de tubulina. Usado pelas células eucarióticas para regular sua forma e controlar seus movimentos.

mili
Prefixo que simboliza 10^{-3}.

miofibrila
Feixe longo, altamente organizado de actina, miosina e outras proteínas no citoplasma das células musculares que contrai por um mecanismo de deslizamento dos filamentos.

miosina
Tipo de proteína motora que usa o ATP para conduzir os movimentos ao longo dos filamentos de actina. Miosina II é uma proteína grande que forma filamentos densos do músculo esquelético. Miosinas menores, como a miosina I, são amplamente distribuídas e responsáveis por muitos movimentos com base na actina.

mitocôndria
Organela envolta por membrana, com o tamanho aproximado de uma bactéria, onde ocorre a fosforilação oxidativa e produção da maior parte do ATP nas células eucarióticas.

mitógeno
Uma molécula-sinal extracelular que estimula a proliferação das células.

mitose
Divisão do núcleo de uma célula eucariótica, envolvendo condensação do DNA em cromossomos visíveis. (Do grego, *mitos,* carretel, referindo-se à aparência exibida pelos cromossomos condensados.)

mol
M gramas de uma substância, onde *M* é sua massa molecular relativa (peso molecular); isso será 6×10^{23} moléculas da substância.

molde
Uma estrutura molecular que serve como padrão para a produção de outras moléculas. Dessa forma, uma sequência específica de nucleotídeos no DNA pode servir como um molde para direcionar a síntese de uma nova fita de DNA complementar.

molécula
Grupo de átomos ligados por ligações covalentes.

molécula de sinalização intracelular
Molécula (geralmente uma proteína) que é parte do mecanismo de transdução e transmissão de sinal dentro de uma célula.

molécula-sinal extracelular
Qualquer molécula presente fora da célula que pode elicitar a resposta dentro da célula quando a molécula se liga a uma proteína receptora. Algumas moléculas-sinal, como hormônios esteroides, podem entrar na célula e atuar em receptores internos, ao passo que outras, como as proteínas, atuam em receptores embebidos na membrana plasmática e expostos sobre a superfície celular.

monômero
Molécula pequena que pode ser ligada a outras moléculas de um tipo similar para formar uma molécula maior (polímero).

morte celular programada – *ver* apoptose

mRNA – *ver* RNA mensageiro

mutação
Uma mudança hereditária produzida aleatoriamente na sequência de nucleotídeos de um cromossomo.

mutação com ganho de função
Uma mutação que aumenta a atividade de um gene, ou ativa-o em circunstâncias inapropriadas; tais mutações são geralmente dominantes.

mutação com perda de função
Uma mutação que reduz ou elimina a atividade de um gene. Tal mutação normalmente é recessiva: o organismo pode funcionar normalmente enquanto manter ao menos uma cópia normal do gene afetado.

mutação pontual
Alteração em um único par de nucleotídeos em uma sequencia de DNA.

mutagênese sítio-dirigida
Técnica em que uma mutação pode ser feita em um sítio particular do DNA.

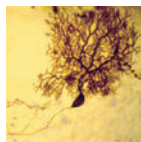
***N*-terminal (aminoterminal)**
A extremidade final de uma cadeia polipeptídica que carrega um grupo α-amino livre.

Na^+
Íon sódio – o principal constituinte iônico das células vivas.

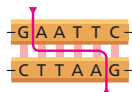
NAD^+ (nicotina adenina dinucleotídeo)
Molécula carreadora ativada que participa em uma reação de oxidação pelo recebimento de um íon hidreto (H^-) de uma molécula doadora produzindo NADH. Amplamente usada na quebra de moléculas de açúcar produzindo energia. *(Ver* Figura 3-34.)

NADPH (fosfato de nicotina adenina dinucleotídeo)
Uma molécula carreadora, intimamente relacionada com NADH, usada como doador de elétrons nas vias de biossíntese. No processo, ele é oxidada à $NADP^+$. (*Ver* Figura 3-35.)

nanômetro (nm)
Unidade de comprimento geralmente usada para medir moléculas e organelas das células. 1 nm = 10^{-3} µm = 10^{-9} m.

neurônio (célula nervosa)
Célula com processos longos especializados em receber, conduzir e transmitir sinais no sistema nervoso.

neurotransmissor
Pequenas moléculas de sinalização secretadas por uma célula nervosa em uma sinapse química para sinalizar à célula pós-sináptica. Exemplos incluem acetilcolina, glutamato, GABA e glicina.

NO – *ver* óxido nítrico

nuclease de restrição (enzima de restrição)
Nuclease que pode clivar uma molécula de DNA em qualquer sítio onde uma pequena sequência específica de nucleotídeos ocorre. Diferentes nucleases de restrição cortam em diferentes sequências. Muito usada na tecnologia do DNA recombinante.

núcleo
A principal organela das células eucarióticas, que contém o DNA organizado dentro dos cromossomos. Quando referente a um átomo, a massa central composta de nêutrons e prótons.

nucléolo
Estrutura grande no núcleo onde o RNA ribossomal é transcrito e as subunidades ribossomais são montadas.

nucleosídeo
Substância composta de uma base púrica ou pirimídica ligada a um açúcar ribose ou a uma desoxirribose. *(Ver* Painel 2-6, p. 74-75.)

nucleossomo
Unidade estrutural semelhante à esfera de um cromossomo eucariótico composto de uma curta extensão de DNA embrulhado ao redor de um núcleo de histonas; a subunidade fundamental da cromatina.

nucleotídeo
Nucleosídeo com um ou mais grupos fosfatos unidos por ligação éster à metade açúcar. DNA e RNA são polímeros de nucleotídeos.

número de Avogadro
O número de moléculas em uma quantidade de substância igual ao seu peso molecular em gramas. Aproximadamente 6×10^{23}.

número *turnover*
Na catálise enzimática, o número de moléculas de substrato processadas em produtos por segundo por molécula de enzima. Embora diferentes tipos de enzimas possam ter muitos diferentes números *turnover,* os números *turnover* de 1.000 ou mais são bastante comuns – uma reflexão do impressionante poder catalítico das enzimas.

oligo-
Prefixo que discrimina um pequeno polímero (oligômero). Pode ser feito de aminoácidos (oligopeptídeo), açúcares (oligossacarídeo) ou nucleotídeos (oligonucleotídeo). (Do grego *oligos,* poucos.)

oncogene
Qualquer gene ativado de forma anormal que pode tornar-se uma célula cancerosa. Geralmente uma forma mutante de um gene normal (proto-oncogene) envolvido no controle do crescimento ou da divisão celular.

organela
Uma estrutura discreta ou um subcompartimento de uma célula eucariótica (especialmente as visíveis no microscópio ótico) que é especializada em desempenhar uma determinada função. Exemplos incluem a mitocôndria e o aparelho de Golgi.

organela envolta por membrana
Qualquer organela em uma célula eucariótica que está envolta por uma membrana de bicamada lipídica, por exemplo, o retículo endoplasmático, o aparelho de Golgi e o lisossomo.

organismo-modelo
Um organismo selecionado para estudos intensivos como um representante de um grupo grande de espécies. Exemplos são o camundongo (representando os mamíferos), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (representando um eucarioto unicelular) e a *Escherichia coli* (representando as bactérias).

organismo transgênico
Uma planta ou animal que incorporou de forma estável um ou mais genes de outra célula ou organismo e pode passá-los para as próximas gerações.

origem de replicação
Local em um cromossomo no qual a replicação de DNA inicia.

osmose
Movimento de moléculas de água através de uma membrana semipermeável dirigida por uma diferença na concentração do soluto sobre ambos os lados. A membrana deve ser permeável à água, mas não às moléculas do soluto.

oxidação
Perda de densidade de elétrons de um átomo, como ocorre durante a adição de oxigênio a uma molécula ou quando um hidrogênio é removido de um átomo de carbono. O oposto é redução. *(Ver* Figura 3-11.)

óxido nítrico (NO)
Molécula pequena altamente difusível, amplamente usada como sinal intracelular.

par de base
Dois nucleotídeos em uma molécula de DNA ou RNA que estão pareados por pontes de hidrogênio – por exemplo, G com C, e A com T ou U.

par redox
Par de moléculas em que uma age como doadora de elétrons e outra como receptora de elétrons em uma reação de oxidação-redução; por exemplo, NADH (doador de elétron) e NAD^+ (receptor de elétron).

pareamento
Em um contexto genético, o evento no início da meiose em que dois cromossomos homólogos se alinham para formar uma estrutura duplicada. (*Ver* também par de base)

parede celular
Camada fibrosa, mecanicamente forte, depositada pela célula na parte externa da membrana plasmática. Proeminente na maioria das plantas, bactérias, algas e fungos, porém ausente na maioria das células animais.

partícula ribonucleoproteica nuclear pequena (snRNP)
Unidade estrutural de um spliceossomo montado de RNA e proteína.

PCR – *ver* reação em cadeia da polimerase

p53
Proteína reguladora que responde à presença de dano ao DNA, prevenindo a célula de entrar na fase S até que o dano seja reparado.

pequeno mensageiro – *ver* segundo mensageiro

pequeno RNA de interferência
Pequenos pedaços de DNA produzidos a partir de RNA de fita dupla durante o processo de interferência de RNA. Ele se pareia com sequências idênticas em outros RNAs, levando à inativação ou destruição do RNA-alvo.

peroxissomo
Pequena organela envolta por membrana que usa o oxigênio molecular para oxidar moléculas orgânicas. Contém algumas enzimas que produzem e outras que degradam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

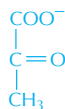
peso atômico
Massa de um átomo expressa em dáltons.

peso molecular
Massa de uma molécula expressa em dáltons.

pinocitose
Tipo de endocitose em que materiais solúveis são captados do ambiente e incorporados em vesículas para a digestão. (Literalmente, “bebida da célula”.)

pirimidina
Um das duas categorias de compostos, contendo anel com nitrogênio, encontrada no DNA ou RNA. Um exemplo é a citosina. *(Ver* Painel 2-6, p. 74-75.)

piruvato
Metabólito formado pela quebra da glicose que provê ligação crucial ao ciclo do ácido cítrico e muitas vias biossintéticas.

COO^-
|
C=O
|
CH_3

PKA – *ver* proteína-cinase C

plasmídeo
Pequenas moléculas de DNA circulares que se replicam independentemente do genoma. Muito usado como um vetor para clonagem de DNA.

plasmodesma (plural plasmodesmata)
Junção célula-célula nas plantas em que um canal do citoplasma revestido por membranas conecta duas células adjacentes por meio de pequenos poros em suas paredes celulares.

polar
Descreve uma molécula, ou uma ligação covalente em uma molécula, em que os elétrons são atraídos mais fortemente a átomos específicos, criando, dessa forma, uma distribuição de cargas elétricas desigual (ou polarizada).

polaridade
Refere-se a uma estrutura como um filamento de actina ou um ovo fertilizado, que possui uma direção inerte – de modo que é possível distinguir uma extremidade da outra.

polimerase
Termo geral para uma enzima que catalisa a adição de subunidades a um polímero. DNA-polimerase, por exemplo, faz o DNA, e RNA-polimerase faz o RNA.

polímero
Molécula grande e geralmente linear feita de unidades repetidas, usando a ligação covalente, de múltiplos idênticos ou unidades similares (monômeros).

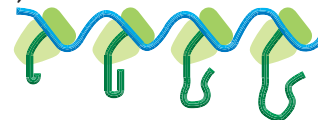
polimorfismo
O caso onde duas ou mais variantes (alelos) de um gene ou variantes de uma sequencia de DNA coexistem na população e são relativamente comuns.

polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)
Sequências no genoma que diferem por um único nucleotídeo entre uma porção da população e outra.

polinucleotídeo
Uma cadeia molecular de nucleotídeos ligados quimicamente por uma série de ligações fosfodiéster. Uma fita de RNA ou DNA.

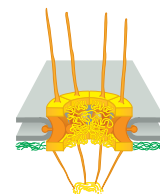
polipeptídeo, cadeia polipeptídica
Polímero linear composto de múltiplos aminoácidos. Proteínas são compostas de uma ou mais cadeias polipeptídicas longas.

polissacarídeo
Polímero linear ou ramificado composto de açúcares. Os exemplos são o glicogênio, ácido hialurônico e celulose.

polissomo (polirribossomo)
Molécula de RNA mensageiro com múltiplos ribossomos ligados que está encarregada da síntese de proteínas.

polo do fuso
Um dos dois centrossomos em uma célula mitótica. Microtúbulos se irradiam desses centrômeros para formar o fuso mitótico.

pontes de hidrogênio
Uma ligação química fraca entre um átomo eletronegativo, como nitrogênio ou oxigênio, e um átomo de hidrogênio ligado a outro átomo eletronegativo.

pontes dissulfeto (ligação S-S)
Ligação covalente formada entre dois grupos sulfidrila de cisteínas. Modo comum de ligar duas proteínas ou diferentes partes de uma mesma proteína no espaço extracelular.

ponto de verificação
Ponto no ciclo de divisão celular eucariótico onde o progresso através do ciclo pode ser suspenso até que as condições sejam favoráveis para a célula prosseguir para o próximo estágio.

poro nuclear
Canal no envelope nuclear que permite que moléculas grandes selecionadas se movam entre o núcleo e o citoplasma.

potencial de ação
Sinal elétrico rápido e transitório, que se autopropaga na membrana plasmática de uma célula, como um neurônio ou músculo. É um impulso nervoso.

potencial de membrana
Diferença de voltagem através da membrana em virtude de um leve excesso de íons positivos em um lado e de íons negativos no outro. Um potencial de membrana típico para uma membrana plasmática de célula animal é –60mV (interior negativo), determinado em relação ao líquido externo.

potencial redox
Uma medida da tendência de um dado par redox doar elétrons (age como um agente redutor) ou receber elétrons (age como um agente oxidante).

pressão osmótica
Pressão que deve ser exercida sobre o lado da menor concentração de soluto de uma membrana semipermeável para impedir o fluxo de água através da membrana como resultado da osmose.

procarioto
Principal categoria de células vivas distintas por ausência de um núcleo. Os procariotos compreendem as arqueas e as eubactérias (normalmente chamadas bactérias), dois dos três domínios da vida.

processamento de RNA
Termo amplo para modificações que um RNA sofre enquanto atinge sua forma madura. Para um mRNA eucariótico, o processamento tipicamente inclui adição do quepe, *splicing* e poliadenilação.

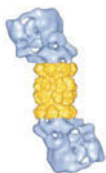
processiva
Descreve uma proteína que realiza repetidos ciclos de catálise ou mudanças conformacionais, enquanto ligadas a um polímero. Uma característica das proteínas motoras envolvidas no transporte, como a cinesina.

prófase
Primeiro estágio da mitose durante o qual os cromossomos são condensados, mas ainda não ligados ao fuso mitótico. Um estágio similar na meiose.

prometáfase
Estágio da mitose que precede à metáfase.

promotor
Sequência de nucleotídeos no DNA à qual a RNA-polimerase se liga para iniciar a transcrição.

protease (proteinase, enzima proteolítica)
Enzima, como a tripsina, que degrada proteínas por hidrólise de algumas das ligações peptídicas.

proteassomo
Grande complexo proteico no citosol que é responsável por degradação de proteínas citosólicas que são marcadas para a destruição pela ubiquitilação ou por algum outro meio.

proteína
A principal macromolécula constituinte das células. Cada proteína é composta de uma ou mais cadeias lineares de aminoácidos ligados por ligações peptídicas em uma sequencia específica. A cadeia de aminoácidos é dobrada em uma forma tridimensional que é única de determinada proteína e determina sua função.

proteína-cinase
Uma de um grande número de enzimas que transfere o grupo fosfato terminal do ATP para uma cadeia lateral específica de aminoácido na proteína-alvo.

proteína-cinase A – *ver* proteína-cinase dependente de AMP cíclico

proteína-cinase C (PKC)
Enzima que fosforila proteínas-alvo em resposta a um aumento nos níveis de diacilglicerol e íons Ca^{+2}.

proteína-cinase dependente de AMP cíclico (proteína-cinase A, PKA)
Enzima que fosforila proteínas-alvo na resposta a um aumento no AMP cíclico intracelular.

proteína-cinase dependente de calmodulina/Ca^{+2} (CaM-cinase)
Enzima que fosforila proteínas-alvo em resposta a um aumento na concentração de íons Ca^{+2} por meio da sua interação com a proteína ligante de Ca^{+2} calmodulina.

proteína-cinase dependente de ciclina (Cdk)
Proteína-cinase que deve estar complexada com uma proteína ciclina para atuar. Diferentes complexos Cdk-ciclina acionam diferentes etapas no ciclo da divisão celular pela fosforilação de proteínas-alvo específicas.

proteína de membrana
Uma proteína associada a uma bicamada lipídica; pode ser integral (transmembrana) ou periférica.

proteína de transporte de membrana
Qualquer proteína inserida em uma membrana que serve como carreador de íons e pequenas moléculas de um lado para outro.

proteína fibrosa
Uma proteína com a forma alongada. Normalmente como o colágeno ou proteínas do filamento intermediário que são aptas a se associar em estruturas filamentosas longas.

proteína fluorescente verde (GFP)
Proteína fluorescente (de uma água-viva) que é amplamente usada como marcador para o monitoramento do movimento das proteínas em células vivas.

proteína-fosfatase (fosfoproteína-fosfatase)
Enzima que move, por hidrólise, um grupo fosfato de uma proteína, geralmente com alta especificidade pelo sítio fosforilado.

proteína G
Membro de uma grande família de proteínas ligadoras de GTP, composta de três diferentes subunidades (proteínas heterotriméricas ligadoras de GTP) as quais são importantes intermediários na via de sinalização intracelular. Geralmente ativada pela ligação de um hormônio ou outro ligante a um receptor transmembrana.

proteína globular
Qualquer proteína com uma forma arredondada. A maioria das enzimas é globular.

proteína inibidora de Cdk
Proteína que inibe o complexo Cdk-ciclina, primeiramente para inibir o progresso pelas fases G_1 e S do ciclo celular.

proteína ligadora de GTP
Proteína alostérica, cuja conformação e atividade são determinadas pela sua associação com GTP ou GDP. Incluem muitas proteínas envolvidas na sinalização celular, como as proteínas Ras e G.

proteína motora
Proteína como a miosina ou a cinesina que usa a energia derivada da hidrólise do ATP para propelir-se ao longo de um filamento proteico ou molécula polimérica.

proteína Rab
Uma família de pequenas proteínas que se ligam ao GTP, presentes nas superfícies de vesículas transportadoras e organelas, que servem como marcadores moleculares identificando cada tipo de membrana. As proteínas Rab ajudam a assegurar que as vesículas de transporte se fusionem apenas com a membrana correta.

proteína receptora
Proteína que detecta um estímulo, geralmente uma mudança na concentração de uma molécula específica, e então inicia uma resposta na célula. Receptores de superfície celular, como o receptor para acetilcolina e o receptor para insulina, estão localizados na membrana plasmática, com seu sítio de ligação exposto ao meio externo. Receptores intracelulares, como os receptores de hormônios esteroides, se ligam a ligantes que se difundem para dentro da célula através da membrana plasmática.

proteína Wnt
Membro da família das Wnt de proteínas de sinalização extracelular com várias funções no desenvolvimento, incluindo a manutenção de células-tronco em um estado proliferativo.

proteoglicano
Molécula que se constitui de uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) ligada a um núcleo de proteína.

proteólise
Degradação de uma proteína por uma protease.

proteômica
O estudo em grande escala de proteínas, investigando várias proteínas diferentes em uma célula ou tecido, simultaneamente.

proto-oncogene – *ver* oncogene

próton
Partícula subatômica encontrada em um núcleo atômico. Também existe como uma espécie química independente, como um íon de hidrogênio positivo (H^+).

protozoário
Um organismo eucariótico membro dos protozoários móveis, de vida livre, não fotossintetizantes e unicelulares. Muitos protozoários, como *Paramecium* ou *Amoeba,* vivem por se alimentar de outros organismos.

purina
Um das duas categorias de compostos contendo anel com nitrogênio encontrado no DNA ou RNA. Exemplos são a adenina e a guanina. (*Ver* Painel 2-6, p. 74-75.)

quiasma
Conexão em forma de X visível entre cromossomos homólogos pareados na divisão I da meiose e que representa um sítio de *crossing-over.*

quilocaloria (kcal)
Unidade de calor igual a 1.000 calorias. Muitas vezes usada para expressar a energia contida nos alimentos ou moléculas: força de ligação, por exemplo, é medida em kcal/mol. Uma unidade alternativa usada é o quilojoule.

quilojoule (kJ)
Unidade-padrão de energia igual a 0,239 quilocalorias.

química orgânica
O ramo da química que estuda compostos feitos de carbono. Inclui essencialmente todas as moléculas com as quais as células vivas são feitas, exceto água e íons de metal como Na^+.

quinona
Pequenas moléculas carreadoras de elétrons móveis, solúveis em água, encontradas na cadeia respiratória e na cadeia de transporte de elétrons fotossintéticas. (*Ver* Figura 14-20.)

Ras
Uma das grandes famílias de pequenas proteínas ligadas ao GTP (também chamadas de GTPases monoméricas) que ajuda a liberar sinais dos receptores da superfície celular para o núcleo. Nomeada por causa do gene *ras,* o primeiro identificado nos vírus que causam sarcomas nos ratos.

RE – *ver* retículo endoplasmático

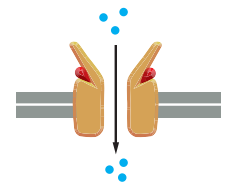
reação acoplada
Uma de um par de reações químicas em que a energia livre liberada por uma reação serve para dirigir a outra reação.

reação de condensação
Tipo de reação química em que duas moléculas orgânicas se ligam por uma ligação covalente com remoção concomitante de uma molécula de água.

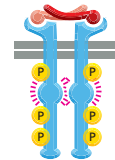
reação em cadeia da polimerase (PCR)
Técnica para a amplificação de regiões específicas do DNA por ciclos múltiplos de polimerização do DNA, cada um seguido de um breve aquecimento para separar fitas complementares.

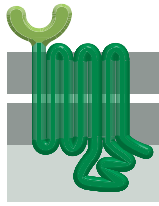
reação redox
Uma reação em que elétrons são transferidos de uma espécie química para outra. Uma reação de oxidação-redução.

receptor
Uma célula (como as células fotorreceptoras dos olhos) ou componente celular (como uma proteína receptora) que detecta um sinal externo e aciona uma resposta celular específica.

receptor acoplado a canal iônico
Proteína receptora transmembrana ou complexo proteico que forma um canal iônico controlado que se abre para a face externa do canal em resposta à ligação de um ligante.

receptor de elétron
Átomo ou molécula que recebe elétrons prontamente, ganhando um elétron e se tornando reduzida.

receptor de serina/treonina-cinase
Receptor acoplado à enzima com um domínio extracelular de ligação ao sinal e um domínio intracelular de cinase que fosforila a serina e a treonina de proteínas de sinalização.

receptor de tirosina-cinase (RTK)
Receptor ligado à enzima no qual o domínio intracelular possui uma atividade de tirosina-cinase, que é ativada pela ligação do ligante ao domínio extracelular do receptor.

receptor ligado à enzima
Proteínas receptoras transmembrana que ativam uma enzima intracelular (uma enzima separada ou parte do próprio receptor) em resposta à ligação de um ligante a uma parte extracelular do receptor.

receptor ligado à proteína G
Receptor da superfície celular que se associa a uma proteína intracelular trimérica ligada à GTP (proteína G) depois da ativação do receptor por um ligante extracelular. Esses receptores são proteínas transmembrana que atravessam sete vezes a membrana plasmática.

receptor nuclear
Proteínas receptoras presentes dentro de uma célula eucariótica que podem ligar-se a moléculas-sinal que entram na célula, como hormônios esteroides; o complexo de receptor nuclear e molécula-sinal subsequentemente atua como um regulador da transcrição.

recombinação
Processo no qual ocorre uma troca de informação genética entre dois cromossomos ou moléculas de DNA. A recombinação mediada por enzima pode ocorrer naturalmente nas células vivas ou em um tubo teste usando DNA e enzimas purificadas que quebrem e religuem as fitas de DNA.

recombinação homóloga
Troca genética entre um par de sequências de DNA idênticas ou muito similares, geralmente localizadas em um par de cromossomos homólogos. Um processo similar é usado para reparar as quebras na fita dupla de DNA.

recombinação sítio-específica
Tipo de recombinação que não requer similaridade extensiva em duas sequências de DNA. Pode ocorrer entre duas diferentes moléculas de DNA ou dentro de uma única molécula.

reconhecimento – *ver* reconhecimento molecular

rede *trans* de Golgi (TGN)
Parte do aparelho de Golgi que é mais afastada do retículo endoplasmático e de onde proteínas e lipídeos são liberados para lisossomos, vesículas secretoras ou superfície celular.

redução
Adição de densidade de elétrons em um átomo, como ocorre durante a adição de hidrogênio a um átomo de carbono ou a remoção de oxigênio desse. O oposto de oxidação. *(Ver* Figura 3-11.)

registro de *patch-clamp*
Técnica em que a ponteira de um eletrodo de vidro pequeno faz o selamento da membrana celular, permitindo a gravação de fluxo de corrente através de canais iônicos individuais no *pach*.

regulador transcricional
Proteína que se liga especificamente a uma sequencia de DNA reguladora e está envolvido no controle de ativação e desativação de um gene.

REL – *ver* retículo endoplasmático liso

reparo de DNA
Termo coletivo para os processos enzimáticos que corrigem as alterações deletérias que afetam a continuidade ou sequência de uma molécula de DNA.

reparo de malpareamento
Importante mecanismo de correção de erros na replicação do DNA, desencadeado pelo malposicionamento *(malpareamento)* de pares de bases não complementares.

replicação de DNA
O processo pelo qual uma cópia de uma molécula de DNA é feita.

repressor
Uma proteína que se liga a uma região reguladora específica do DNA para prevenir a transcrição de um gene adjacente.

repressor do triptofano
Uma proteína bacteriana que, em presença do triptofano, liga-se a uma região específica do DNA e abole a produção das enzimas biossintéticas do triptofano.

reprodução assexuada
Qualquer tipo de reprodução (como brotamento em *Hydra,* fissão binária em bactérias ou divisão mitótica em microrganismos eucarióticos) que não envolve formação de gameta nem fusão. Ela produz um indivíduo geneticamente idêntico aos pais.

reprodução sexuada
Tipo de reprodução em que os genomas de dois indivíduos são misturados na formação de um novo organismo. Indivíduos produzidos pela reprodução sexuada diferem tanto de seus pais como um do outro.

respiração
Termo geral para qualquer processo em uma célula em que a captação de oxigênio molecular (O_2) está acoplada à produção de CO_2.

resposta à proteína não dobrada
Resposta celular acionada pelo acúmulo de proteínas maldobradas no retículo endoplasmático. A célula produz mais retículo endoplasmático e mais da maquinaria molecular necessária para restabelecer o dobramento apropriado da proteína e seu processamento.

retículo endoplasmátido (RE)
Compartimento ligado à membrana, como um labirinto, no citoplasma das células eucarióticas, onde lipídeos e proteínas secretadas e ligadas à membrana são sintetizadas.

retículo endoplasmático liso (REL)
Região do retículo endoplasmático que não se associa a ribossomos; envolvido na síntese de lipídeos.

retículo endoplasmático rugoso (RER)
Região do retículo endoplasmático associada a ribossomos e envolvida na síntese de proteínas secretadas e ligadas à membrana.

retrotransposon
Tipo de elemento genético móvel que se move por ser primeiro transcrito em uma cópia de RNA que é então convertida novamente em DNA pela transcriptase reversa e inserida em outra região dos cromossomos.

retrovírus
Vírus que contém RNA que se replica em uma célula por fazer inicialmente uma fita dupla de DNA intermediário. Esse DNA é inserido no cromossomo de uma célula onde pode ser mantido por longo tempo e é transcrito para produzir novos genomas viras e mRNAs que codificam para proteínas virais.

ribossomo
Partícula composta de RNAs ribossomais e proteínas ribossomais que se associam a RNA mensageiro e catalisam a síntese de proteína.

riboswitch
Sequencias curtas dentro de alguns RNAs que alteram sua conformação quando ligadas especificamente a pequenas moléculas, como metabólitos, e assim regulam a transcrição ou a tradução.

ribozima
Uma molécula de RNA que possui propriedades catalíticas.

RNA (ácido ribonucleico)
Um polinucleotídeo de fita simples (normalmente) na forma de uma cadeia de subunidades de ribonucleotídeos ligados covalentemente. É sintetizado quando uma RNA-polimerase copia a sequência de nucleotídeos do DNA. O RNA cumpre uma variedade de funções nas células. *Ver, por exemplo,* RNA mensageiro, microRNA, RNA ribossomal, RNA de transferência.

RNA de interferência (RNAi)
Mecanismo celular ativado por moléculas de RNA de fita dupla que resulta na destruição de RNAs que contêm uma sequência de nucleotídeos similares. É amplamente explorado como uma ferramenta experimental para prevenir a expressão de genes selecionados (silenciamento gênico).

RNA mensageiro (mRNA)
Molécula de RNA que determina a sequência de aminoácidos de uma proteína. É produzido pelo *splicing* do RNA (em eucariotos) a partir de uma molécula de RNA maior feita pela RNA-polimerase como uma cópia complementar do DNA. Ela é traduzida em proteína em um processo catalisado pelo ribossomo.

RNA nuclear pequeno (snRNA)
Moléculas de RNA com aproximadamente 200 nucleotídeos, envolvidas no *splicing* de RNA.

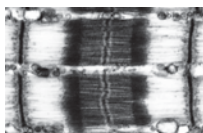
RNA-polimerase
Enzima que catalisa a síntese de uma molécula de RNA com base em um DNA-molde a partir de precursores nucleosídeos trifosfatados.

RNA ribossomal (rRNA)
Qualquer uma de um número de moléculas de RNA específicas que forma parte da estrutura de um ribossomo e participa na síntese de proteínas. Muitas vezes distinguidas pelo seu coeficiente de sedimentação, como rRNA 28S ou rRNA 5S.

RNA transportador (tRNA)
Conjunto de pequenas moléculas de RNA usadas na síntese de proteínas como uma interface (adaptador) entre o mRNA e os aminoácidos. Cada tipo de molécula de tRNA está covalentemente ligada a um determinado aminoácido.

rRNA – *ver* RNA ribossomal

RTK – *ver* receptor de tirosina-cinase

sarcômero
Unidades de repetição de uma miofribrila em uma célula muscular, em torno de 2,5 μm de comprimento, composta de um arranjo de filamentos grossos (miosina) e finos (actina) sobrepostos.

saturada
Descreve uma molécula orgânica que não contém ligações duplas ou triplas entre carbonos. Não é insaturada.

secreção
Produção e liberação de uma substância de uma célula.

segundo mensageiro
Pequena molécula formada ou liberada no citosol em resposta a um sinal extracelular que ajuda a transmitir o sinal para o interior da célula. Exemplos incluem cAMP, IP_3 e Ca^{+2}.

seleção de purificação
Processo de seleção durante a evolução no qual indivíduos que carregam mutações que interferem em funções importantes são eliminados.

sequência
A ordem linear dos monômeros em uma molécula grande, por exemplo, aminoácidos em uma proteína ou nucleotídeos no DNA. Em geral, a sequência de uma macromolécula especifica sua precisa função biológica.

sequência de aminoácidos
A ordem dos resíduos de aminoácidos em uma cadeia proteica. Algumas vezes, chamada de estrutura primária de uma proteína.

sequência de DNA reguladora
Sequência de DNA a qual um regulador da transcrição se liga para determinar quando, onde e em qual quantidade um gene deverá ser transcrito em RNA.

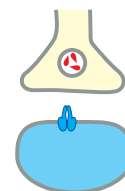
sequência-sinal
Sequência de aminoácidos que direciona uma proteína a um local específico na célula, como o núcleo ou a mitocôndria.

sequenciamento de DNA didesoxi
O método-padrão de sequenciamento de DNA. Utiliza DNA-polimerases e nucleotídeos terminadores de cadeia.

serina/treonina-cinase
Enzima que fosforila serinas ou treoninas específicas de proteínas.

simbiose
Associação íntima entre dois organismos de diferentes espécies em que ambos adquirem uma vantagem seletiva a longo prazo.

sinalização celular
Os mecanismos moleculares pelos quais células detectam e respondem a estímulos externos e enviam mensagens para outras células.

sinapse
Junção especializada entre uma célula nervosa e outra célula (célula nervosa, célula muscular, célula glandular) através da qual o impulso nervoso é transferido. Na maioria das sinapses, o sinal é carregado por um neurotransmissor, que é secretado pelas células nervosas e se difunde até as células-alvo.

sintenia conservada
Regiões do genoma onde os genes correspondentes estão na mesma ordem nas espécies sendo comparadas.

siRNA – *ver* pequeno RNA de interferência

sistema de controle do ciclo celular
Complexo de proteínas reguladoras que governam a progressão de uma célula eucariótica através do ciclo celular.

sítio ativo
Região especializada da superfície da enzima onde uma molécula de substrato se liga antes de sofrer a reação catalisada.

sítio de ligação
Região sobre a superfície de uma proteína, geralmente uma cavidade ou fenda, que é complementar à forma de uma se-

gunda molécula (o ligante) e estabelece múltiplas ligações não covalentes.

SNARE
Uma das famílias de proteínas de membrana responsável pela fusão seletiva de vesículas com a membrana-alvo.

SNP – *ver* polimorfismo de nucleotídeo único

snRNA – *ver* RNA nuclear pequeno

snRNP – *ver* ribonucleoproteína nuclear pequena

soluto
Qualquer molécula que é dissolvida em um líquido. O líquido é chamado de solvente.

spliceossomo
Grande montagem de RNA e moléculas proteicas que retiram os íntrons do pré-mRNA nas células eucarióticas.

***splicing* alternativo**
O *splicing* de transcritos de RNA de formas diferentes a partir do mesmo gene, cada um produzindo uma proteína distinta.

***splicing* de RNA**
Processo em que sequências de íntrons são retiradas das moléculas de RNA no núcleo durante a formação do RNA mensageiro.

substituição gênica
A substituição de um gene normal em um organismo por um gene que foi mutado *in vitro*; usado para investigar a função gênica.

substrato
Uma molécula sobre a qual uma enzima age.

substratum
Superfície sólida onde uma célula se adere.

subunidade
Um monômero que forma parte de uma molécula maior, como um resíduo de aminoácido em uma proteína ou um resíduo de nucleotídeo em um ácido nucleico. Também pode referir-se a uma molécula completa que faz parte de uma molécula maior. Muitas proteínas, por exemplo, são compostas de múltiplas cadeias polipeptídicas, cada uma é uma subunidade de proteína.

superenrolamento
Estrutura proteica estável em forma de bastão formada por duas ou mais α-hélices torcidas ao redor delas mesmas.

tampão
Qualquer ácido ou base fraca que perde ou ganha prótons e dessa forma sirva para manter o pH sob várias condições.

tecido
Massa organizada de células com uma função específica que forma uma parte distinta de uma planta ou animal.

tecido conectivo
Tecidos, como ossos, tendões e derme da pele, em que a matriz extracelular é abundante e realiza a parte mecânica.

tecnologia de DNA recombinante (engenharia genética)
A coleção de técnicas pelas quais segmentos de DNA de diferentes origens são combinados para fazer um novo DNA. DNAs recombinantes são amplamente usados na clonagem de genes, em modificação genética de organismos e geralmente em biologia molecular.

telófase
Estágio final da mitose em que dois conjuntos de cromossomos separados se descondensam e se tornam envoltos pelo envelope nuclear.

telomerase
Enzima que alonga telômeros, as sequências repetitivas de nucleotídeos que são encontradas nas extremidades de cromossomos eucarióticos.

telômero
Estrutura nas extremidades de cromossomos lineares, associada a uma sequência de DNA característica que é replicada de uma maneira especial. Contrapõe-se à tendência do cromossomo a se encurtar a cada ciclo de replicação. (Do grego *telos*, "extremidade".)

terminal amino – *ver* N-terminal

terminal nervoso
Extremidade de um axônio a partir da qual sinais são enviados para as próximas células, normalmente em uma sinapse.

tipo selvagem
Forma não mutada, normal, de uma espécie resultante de procriação sob condições naturais.

tirosina-cinase
Enzima que fosforila tirosina em proteínas específicas.

traço complexo
Uma característica hereditária cuja transmissão para a progênie não obedece às leis de Mendel. Tais traços, altura por exemplo, frequentemente resultam a partir de interações de genes múltiplos, cada um herdado por herança mendeliana.

tradução
Processo em que uma sequência de nucleotídeos em uma molécula de RNA mensageiro direciona a incorporação de aminoácidos em uma proteína; ocorre em um ribossomo.

trans
Além, ou no outro lado.

transcrição
Um processo que utiliza uma fita de DNA como molde para sintetizar uma sequência de RNA complementar, algumas vezes chamado de transcrito primário, catalisado pela enzima RNA-polimerase.

transcrição de DNA – *ver* transcrição

transcriptase reversa
Enzima que faz uma cópia de fita dupla de DNA a partir de uma molécula-molde de fita simples de RNA. Presente nos retrovírus e como parte da maquinaria de transposição dos retrotranspósons.

transcrito primário – *ver* transcrição

transdução de sinal
Conversão de um impulso ou estímulo de uma forma física ou química para outra. Em biologia, o processo em que uma célula responde a um sinal extracelular.

transferência horizontal de gene
Processo através do qual o DNA é passado de um organismo para outro, mudando permanentemente a composição do DNA do recipiente. Isso contrasta com a transferência "vertical" de gene, que se refere à herança de genes dos pais para a prole.

transformação
Processo em que as células captam moléculas de DNA de seus arredores e então expressam genes naquele DNA.

transportador
Proteína de membrana que transporta íons ou moléculas através da membrana celular.

transportador acoplado
Proteína de transporte de membrana que realiza o transporte no qual a transferência de uma molécula depende da transferência simultânea ou sequencial de uma segunda molécula.

transporte ativo
Movimento de uma molécula através da membrana, promovido pela hidrólise de ATP ou outra forma de energia metabólica.

transporte passivo
O movimento de pequenas moléculas ou íons através da membrana devido a uma diferença na concentração ou carga elétrica.

transporte vesicular
Transporte de material entre organelas na célula eucariótica via vesículas envolvidas por membrana.

transpóson
Nome geral para segmentos curtos de DNA que podem mover-se de um local para outro no genoma. Também conhecido como elemento genético móvel.

triacilglicerol
Éster de glicerol de ácidos graxos. O principal constituinte das gotículas de gordura no tecido animal (onde os ácidos graxos são saturados) e do óleo vegetal (onde os ácidos graxos são principalmente insaturados).

tRNA – *ver* RNA transportador

tRNA iniciador
tRNA especial que inicia a tradução. Ele sempre carrega o aminoácido metionina.

tubulina
Proteína da qual os microtúbulos são feitos.

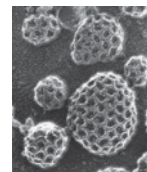
variação de energia livre *(ΔG)*
"Delta G": a diferença na energia livre entre as moléculas dos reagentes e dos produtos em uma reação química. Um valor negativo alto de ΔG indica que a reação tem uma tendência forte em ocorrer. A variação de energia livre padrão ($\Delta G°$) é a variação de energia livre medida em uma concentração, temperatura e pressão definidas.

valência
Para um átomo, o número de elétrons que ele deve receber ou doar (por compartilhamento ou transferência de elétrons) para alcançar uma camada externa completa mais prontamente. Então, por exemplo, a valência do Na é um (ele deve doar um elétron), e a valência do Cl é um (ele deve receber um elétron). A valência de um átomo é igual ao número de ligações simples que o átomo pode formar.

varredura genética
Pesquisa em uma coleção de mutantes por um determinado fenótipo.

vesícula
Pequenas organelas esféricas, envolvidas por membrana, no citoplasma de uma célula eucariótica.

vesícula de transporte
Vesículas de membrana que carregam proteínas de um compartimento intracelular para outro, por exemplo, do RE para o aparelho de Golgi.

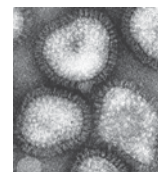
vesículas revestidas
Pequenas organelas envoltas por membrana com uma rede de proteínas (o revestimento) na sua superfície citosólica. Ela é formada pelo estrangulamento de uma região revestida de proteína da membrana.

vesícula secretora
Organela envolvida por membrana em que moléculas destinadas para a secreção são estocadas antes da liberação. Algumas vezes são chamadas de grânulos secretórios pela coloração escura do seu conteúdo, o que faz a organela visível como um objeto sólido pequeno.

vesícula sináptica
Pequenos sacos de membrana preenchidos com neurotransmissores que liberam seu conteúdo por exocitose em uma sinapse.

vetor
Elemento genético, geralmente um bacteriófago ou plasmídeo, que é usado para carregar um fragmento de DNA para um recipiente celular para a clonagem de gene.

via de sinalização intracelular
O conjunto de proteínas e pequenas moléculas segundo mensageiro que interage com cada uma para liberar um sinal a partir da membrana celular até seu destino final no citoplasma ou núcleo.

via metabólica
Sequência de reações enzimáticas em que o produto de uma reação é o substrato da próxima.

vírus
Partícula que se constitui de ácidos nucleicos (RNA ou DNA), envolta por uma capa de proteína e capaz de se replicar dentro de uma célula hospedeira e se espalhar de célula para célula. Muitas vezes, a causa de doenças.

$V_{máx}$
A velocidade máxima de uma reação enzimática, medida imediatamente depois da adição do substrato a uma concentração suficiente para ocupar os sítios ativos de todas as moléculas de enzima presentes.

zigoto
Célula diploide produzida pela fusão de um gameta masculino e um gameta feminino. É um óvulo fertilizado.

Índice

Os números das páginas seguidos por um F se referem a uma figura, e com FF, a figuras consecutivas; os números das páginas seguidos por T se referem a tabelas.

A

B

C

D

E

F

G

H

I

J

K

L

M

N

O

Q

R

S

T

U

V

W

X

Z